

Université de Sherbrooke

**Influence de la portion C-terminale de CA125 sur les
caractéristiques associées à la tumorigénicité**

Par : Catherine Thériault

Département de microbiologie et d'infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de Maître ès sciences en microbiologie

15 mai 2009

Évaluateurs : Du département de microbiologie et d'infectiologie, Dre. Claudine
Rancourt (Directrice des travaux) et Dr. Brendan Bell et du département de
biologie cellulaire, Dre. Nathalie Perreault



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-64340-2
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-64340-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

■ ■ ■
Canada

Résumé

Le cancer de l'ovaire est le cancer gynécologique le plus létal. L'absence de symptômes aux stades précoces de la maladie serait en grande partie responsable de ce faible taux de survie. Comme pour tous les cancers, l'indépendance aux signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, la résistance à l'apoptose, l'immortalisation des cellules, l'angiogénèse, l'invasion et la formation de métastase sont des facteurs qui peuvent favoriser la formation et la progression d'un cancer de l'ovaire. La majorité des cancers de l'ovaire exprimerait l'antigène tumoral CA125. On connaît actuellement très peu de choses sur les fonctions et les rôles de cette protéine qui fait partie de la famille des mucines. Cependant, des études rapportées par d'autres groupes de recherche ont démontré que certaines mucines peuvent jouer des rôles importants dans le développement et la progression de différents cancers.

Des résultats préalablement obtenus par notre laboratoire indiquent que l'expression de cette protéine favoriserait la tumorigénicité des cellules à différents niveaux. Afin d'approfondir nos connaissances sur les fonctions de CA125, des populations stables de cellules exprimant la portion carboxy terminale de la protéine ont été générées dans différentes cultures cellulaires. Les effets du domaine carboxy terminal de CA125 sur la transformation cellulaire, les caractéristiques associées à la tumorigénicité, les jonctions cellulaires et les différentes composantes du cytosquelette ont été analysés.

Les résultats ont démontré que, chez la lignée cancéreuse de l'ovaire SKOV-3, le domaine carboxy terminal de CA125 favorise l'indépendance des cellules aux signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance et la résistance à différents agents génotoxiques utilisés en chimiothérapie. Des expériences effectuées chez les souris indiquent également que les effets du domaine carboxy terminal de CA125 chez les SKOV-3 augmentent grandement leur tumorigénicité. Ainsi, les résultats obtenus avec la lignée SKOV-3 semble indiquer que CA125 pourrait agir comme un oncogène tel que démontré chez d'autres mucines.

Les effets du domaine carboxy terminal de CA125 sur différentes cellules non-transformées immortalisées ou non ont ensuite été évalués. Globalement, les effets observés chez la lignée SKOV-3 n'ont pas été observés chez les cellules non-transformées analysées. Le domaine carboxy terminal de la protéine n'a pas non plus été en mesure de transformer les différentes cellules étudiées. Cependant, chez la majorité des populations exprimant le domaine carboxy terminal un allongement de la morphologie des cellules a été observé. Ce changement de morphologie semble indiquer que l'expression de la portion carboxy terminale de CA125 favorise l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse.

Pour conclure, bien que le domaine carboxy terminal semble favoriser fortement la tumorigénicité des cellules cancéreuses SKOV-3 aucun effet important n'a été remarqué chez les différentes cellules non-transformées analysées. Il est possible

que cette absence de phénotype chez les cellules non-transformées découle du fait que les populations contrôles servant de base de comparaison auraient effectuées une transition épithélio-mésenchymateuse en réponse aux conditions de culture cellulaire. Également, les effets du domaine carboxy terminal de CA125 seraient peut être dépendant de l'expression d'oncogènes supplémentaires exprimés chez les SKOV-3.

Mots clefs : Cancer de l'ovaire, tumorigénicité, transformation, MUC16, CA125

Table des matières

Table des matières.....	II
Liste des tableaux.....	IX
Liste des figures.....	X
Liste des sigles, abréviations et symboles.....	XIV
Résumé.....	XVII
Introduction.....	1
1. Le cancer.....	1
1.1. Autosuffisance par rapport aux signaux de croissance.....	2
1.2. Insensibilité face aux facteurs inhibiteurs de croissance.....	4
1.3. Résistance à l'apoptose.....	6
1.4. L'immortalisation des cellules.....	8
1.5. L'angiogénèse.....	9
1.6. L'invasion et la formation de métastases.....	10
2. Le cancer de l'ovaire.....	14
2.1. Le développement d'un cancer de l'ovaire.....	15
2.2. Les cellules épithéliales de l'ovaire.....	17
2.3. Suivi et traitement des cancers de l'ovaire.....	23
3. La famille des mucines.....	24
3.1. Les fonctions associées aux mucines.....	26
3.2. Les mucines et le cancer.....	28

4. CA125/MUC16.....	30
4.1. La structure et les domaines de CA125.....	31
4.2. Les interactions de CA125 avec d'autres protéines.....	37
4.3. Les fonctions associées à CA125.....	38
5. Modèles d'études utilisés et résultats obtenus par le laboratoire.....	39
5.1. Le modèle perte de fonction.....	39
5.2. Le modèle gain de fonction.....	40
5.3. Résultats obtenus jusqu'à présent par le laboratoire.....	43
5.4. Hypothèse et but du projet.....	46
Matériel et méthodes.....	48
6. Lignées cellulaires utilisées et culture cellulaire.....	48
7. Construction des lentivirus.....	52
7.1. Isolation de l'insert CTD.....	52
7.2. Construction du vecteur pLenti/Adapteur CTD.....	54
7.3. Transformation de bactéries STBL-3 compétentes.....	55
7.4. Analyse des vecteurs pLenti/Adapteur CTD positifs.....	56
7.5. Production des lentivirus.....	57
8. Infection des lignées cellulaires et établissement de populations stables.....	60
9. Validation des populations cellulaires.....	62
9.1. Extraction d'ARN et RT PCR.....	62
9.2. Immunobuvardage de type Western.....	64
9.3. Immunofluorescence.....	66

10. Comparaison de la morphologie cellulaire.....	69
11. Formation de foyers post confluence.....	69
12. Croissance en présence d'ancrage limité.....	69
13. Formation de sphéroïdes.....	70
14. Expérience de migration par blessure de la monocouche cellulaire.....	71
15. Clonogénicité sur plastique.....	71
16. Sensibilité au cisplatine.....	72
17. Microscopie électronique à transmission.....	72
18. Immunofluorescence.....	73
19. Formation de tumeurs chez des souris.....	74
20. Western.....	75
21. Exposition des cellules au HGF.....	76
Résultats.....	78
22. Expériences sur les populations SKOV-3.....	78
23. Évaluation de la vitesse de croissance.....	78
24. Formation de foyers post-confluence.....	79
25. Croissance en présence d'ancrage limité.....	81
26. Croissance des populations SKOV-3 chez les souris NUDE.....	82
27. Croissance des différentes populations SKOV-3 dans la cavité intrapéritonéale de souris SCID.....	84
28. Construction du vecteur pLenti CTD.....	87

29. Infection et validation des lignées cellulaires non-transformées immortalisées ou non HFL-1 et NIH 3T3.....	92
30. Expériences de transformation.....	97
30.1. Formation de foyers post-confluence.....	97
31. Infection de cellules OVN non-transformées non-immortalisées et validation.....	99
32. Évaluation de la transformation des cellules.....	104
33. Infection des lignées immortalisées OVN95T hTERT et OVN211T hTERT et validation.....	104
34. Expériences de transformation.....	110
34.1. Formation de foyers post-confluence.....	110
34.2. Expérience de croissance en agar mou.....	111
35. Évaluation de différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité.....	112
35.1. Formation de sphéroïdes.....	113
35.2. Clonogénicité sur plastique.....	115
35.3. Expérience de migration par blessure de la monocouche.....	116
36. Sensibilité au cisplatine.....	117
37. Microscopie électronique sur les OVN95T hTERT.....	119
38. Analyse du patron d'expression de protéines d'adhésion.....	122
38.1. IF et Western pour la N-cadhérine.....	122
38.2. IF et Western pour la E-cadhérine.....	124
38.3. IF pour la β -caténine.....	126
39. IF sur différentes composantes du cytosquelette.....	128

39.1. IF pour les cytokératines 8 et 18.....	128
39.2. IF pour la vimentine.....	129
39.3. IF pour la F-actine.....	130
40. Effet du CTD sur la voie du HGF.....	131
Discussion.....	134
41. Rappel.....	134
42. Expériences faites avec les populations SKOV-3.....	136
42.1. Aucun effet sur la vitesse de croissance des cellules.....	136
42.2. Diminution de l'inhibition de contact chez la population SKOV-3 CTD.....	137
42.3. Augmentation de la croissance en présence d'ancrage limité.....	138
42.4. La portion CTD de CA125 augmente la tumorigénicité des cellules chez les souris NUDE.....	139
42.5. La portion CTD de CA125 diminue le temps de survie des souris SCID.....	140
43. Infection des lignées cellulaires non-transformées immortalisées ou non HFL-1 et NIH 3T3.....	141
43.1. Aucun effet du CTD de CA125 chez les NIH 3T3.....	143
43.2. L'expression du CTD de CA125 induit un léger changement de morphologie chez les cellules HFL-1.....	144
44. Hypothèse sur les bandes observées par Western.....	146
45. Peu d'effet du CTD de CA125 chez des OSE.....	150

46. Infection des OVN95T hTERT et des OVN211T hTERT.....	153
47. Expériences de transformation chez les OVN95T hTERT.....	156
47.1. Aucun effet du CTD de CA125 sur la formation de foyers post confluence chez les OVN95T hTERT.....	156
47.2. L'expression du CTD de CA125 ne permet pas aux cellules de croître en agar mou.....	157
48. Évaluation des effets du CTD de CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité.....	158
48.1. L'expression du CTD de CA125 n'influence pas la formation de sphéroïdes chez les OVN95T hTERT.....	158
48.2. La clonogénicité sur plastique des OVN95T hTERT n'est pas modifiée par l'expression du CTD de CA125.....	160
48.3. Le CTD de CA125 n'influence pas la migration des OVN95T hTERT.....	161
49. Le CTD de CA125 n'influence pas la résistance au cisplatine des OVN95T hTERT.....	163
50. Analyse des jonctions cellulaires.....	163
50.1. Aucune différence entre les différentes populations par microscopie électronique à transmission.....	164
50.2. L'expression de la N-cadhérine et de la E-cadhérine n'est pas influencée par la portion CTD de CA125.....	165
50.3. La portion CTD de CA125 n'influence pas le patron d'expression de la β -caténine.....	166

50.4. Aucun effet du CTD de CA125 sur les jonctions cellulaires et les protéines qui y sont associées.....	167
51. Analyse des effets du CTD de CA125 sur le cytosquelette.....	168
51.1. EMT chez toutes les populations OVN95T hTERT.....	168
51.2. Le CTD de CA125 n'influence pas le patron d'expression de la F-actine.....	170
52. Analyse de la voie de signalisation du HGF.....	171
Conclusion.....	174
53. Les effets du CTD de CA125 semblent restreints aux cellules cancéreuses.....	174
54. Perspectives.....	175
Remerciements.....	177
Références.....	178

Liste des tableaux

Tableau 1 : Autres cancers qui peuvent être caractérisés par une augmentation de CA125.....	31
Tableau 2 : Caractéristiques associées au gain ou à la perte de CA125.....	44
Tableau 3 : Informations sur les lignées cellulaires utilisées.....	50
Tableau 4 : Milieux de culture utilisés pour chaque lignée cellulaire.....	51
Tableau 5 : Concentration de blasticidine pour la sélection des différentes lignées.....	61
Tableau 6 : Anticorps utilisés lors des validations.....	68
Tableau 7 : Anticorps utilisés lors des immunofluorescences.....	74
Tableau 8 : Anticorps utilisés lors des expériences de Western.....	77

Liste des figures

Figure 1 : Les six grandes caractéristiques habituellement nécessaires au développement d'un cancer.....	2
Figure 2 : Les quatre étapes du cycle cellulaire et quelques protéines régulatrices de celui-ci.....	6
Figure 3 : Les étapes associées à la formation de métastases.....	12
Figure 4 : Le patron de formation de métastases du cancer de l'ovaire.....	14
Figure 5 : Schéma des étapes associées à la transition épithélio-mésenchymateuse.....	21
Figure 6 : Morphologie des OSE.....	22
Figure 7 : Carte du chromosome 19.....	32
Figure 8 : Schématisation d'une répétition.....	34
Figure 9 : Séquence du domaine C-terminal de CA125.....	35
Figure 10 : Structure de CA125 proposée par le groupe O'Brien en 2001.....	36
Figure 11 : Validation des clones knockdowns de CA125.....	42
Figure 12 : Validation des populations SKOV-3.....	43
Figure 13 : Plasmides utilisés lors de la construction du plasmide pLenti CTD2...52	52
Figure 14 : Construction pLenti CTD.....	57
Figure 15 : Les plasmides utilisés pour la production de lentivirus.....	59
Figure 16 : Vitesse de croissance des cellules.....	79
Figure 17 : Formation de foyers post-confluence.....	80

Figure 18 : Nombre de colonie formée en agar mou chez les différentes populations SKOV-3.....	81
Figure 19 : Taille des colonies formées en agar mou.....	82
Figure 20 : Masses des tumeurs formées chez les souris NUDE par les différentes populations SKOV-3.....	83
Figure 21 : Temps de survie des souris injectées de façon intrapéritonéale avec les différentes populations SKOV-3.....	85
Figure 22 : Quantité d'implants macroscopiques retrouvée chez différentes souris injectées de façon intrapéritonéale avec les différentes populations SKOV-3.....	86
Figure 23 : Masse des implants macroscopiques retrouvées chez différentes souris injectées de façon intrapéritonéale avec les différentes populations SKOV-3.....	89
Figure 24 : Minipreps de colonies transformées par des pLenti6V5/Adapteur CTD.....	85
Figure 25 : Validation du clone pLenti CTD2.....	90
Figure 26 : Nomenclature utilisée pour les populations établies.....	91
Figure 27 : Efficacité d'infection des NIH 3T3 et des HFL-1.....	92
Figure 28 : Morphologie des différentes populations NIH 3T3 et HFL-1.....	93
Figure 29 : Validation des populations NIH 3T3 CTD2 et HFL-1 CTD2 par RT PCR.....	95
Figure 30 : Western pour la validation des populations CTD2.....	96
Figure 31 : Expérience de foyers post confluence chez les NIH 3T3.....	98
Figure 32 : Efficacité d'infection des OVN321T, OVN225T et des OVN221T.....	99
Figure 33 : Morphologie des populations OVN221T, OVN225T et OVN321T...	101

Figure 34 : Validation des populations OVN221T CTD2 par RT PCR.....	102
Figure 35 : Western pour la validation des populations OVN221T CTD2.....	103
Figure 36 : Efficacité d'infection des OVN95T hTERT et OVN211T hTERT....	105
Figure 37 : Morphologie des différentes populations OVN95T hTERT et OVN211T hTERT.....	106
Figure 38 : Validation des populations OVN95T hTERT CTD2 par RT PCR.....	107
Figure 39 : Western pour la validation des populations OVN95T hTERT CTD.....	108
Figure 40 : Validation des populations OVN95T hTERT et OVN211T hTERT par IF.....	109
Figure 41 : Expérience de foyers post-confluence chez les OVN95T hTERT.....	111
Figure 42 : Formation de sphéroïdes.....	114
Figure 43 : Viabilité des cellules qui forment les sphéroïdes.....	115
Figure 44 : Efficacité d'ensemencement des populations OVN95T hTERT.....	116
Figure 45 : Expérience de migration par blessure de la monocouche.....	117
Figure 46 : Sensibilité des populations OVN95T hTERT au cisplatine.....	119
Figure 47 : Microscopie électronique.....	121
Figure 48 : IF pour la N-cadhérine chez les populations OVN95T hTERT.....	123
Figure 49 : Western pour la N-cadhérine chez les populations OVN95T hTERT.....	124
Figure 50 : IF pour la E-cadhérine chez les populations OVN95T hTERT.....	125
Figure 51 : Western pour la E-cadhérine chez les populations OVN95T hTERT.....	126

Figure 52 : IF pour la β -caténine chez les populations OVN95T hTERT.....	127
Figure 53 : IF pour les cytokératines 8 et 18 chez les populations OVN95T hTERT.....	129
Figure 54 : IF pour la vimentine chez les populations OVN95T hTERT.....	130
Figure 55 : IF pour la F-actin chez les populations OVN95T hTERT.....	131
Figure 56 : Exposition des populations OVN95T hTERT au HGF.....	133

Liste des sigles, abréviations et symboles

ADN: Acide désoxyribonucléique

AEBSF : 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride

ARN: Acide ribonucléique

bFGF : Basic fibroblast growth factor

BRCA1: Breast cancer 1

BRCA2: Breast cancer 2

CA125: Cancer antigen 125

C-terminal: Carboxy terminal

CTD: Domaine carboxy-terminal

Cellules NK: Cellules natural killer

DAPI: 4'6-diamidino-2-phenylindole·2HCl

DEPC: Diethylpyrocarbonate

DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : Ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)tetraacetic acid

EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse

EV: Empty vector

FGFR2: Fibroblast growth factor receptor-2

FSP1: Protéine spécifique des fibroblastes-1

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GFP: Green fluorescent protein

HGF: Hepatocyte growth factor

HRP: Horseradish peroxidase

IL-6: Interleukine-6

IF : Immunofluorescence

JNK : C-jun N-terminal kinase

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MEC : Matrice extracellulaire

MET : Transition mésenchymateuse-épithéliale

MFs : Microfilaments

NP-40 : Nonidet P-40

N-terminal: Amino terminal

NUDE : Nue / sans pelage

OSE : Cellules épithéliales de l'ovaire

PAK1 : p21-activated kinase 1

PCR: Polymerase chain reaction

PBS: Phosphate buffered saline

PDGF : Platelet-derived growth factor

pRb: Retinoblastoma protein

PVDF: Polyvinylidene difluoride

RT-PCR: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SCID: Severe combined immunodeficiency

scFv: Single-chain fragment variable

SDS: Sodium dodecyl sulphate

SEA: Sea urchin enterokinase

TAE: Tris-acetate-EDTA buffer

TGF β : Transforming growth factor β

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Introduction

1. Le cancer

Le cancer est actuellement la principale cause de mortalité au Canada devançant de peu les maladies cardio-vasculaires. Il est estimé que 40% des femmes et que 45% des hommes seront atteints d'un cancer au cours de leur vie. Il existe plusieurs types de cancers dont la fréquence varie grandement. Les plus communs sont entre autres les cancers du poumon, du sein et de la prostate. Les différents types de cancer possèdent également des pronostiques qui varient grandement. Ainsi, le cancer du sein est actuellement doté d'un bon taux de rémission et de guérison comparativement au cancer de l'ovaire qui est caractérisé par un taux élevé de mortalité (CANADIAN CANCER STATISTICS, 2008).

Malgré les nombreuses différences entre les divers types de cancer, les principes qui gouvernent le développement d'un cancer demeurent sensiblement les mêmes d'un type à l'autre. Pour qu'une cellule devienne cancéreuse, elle doit subir un certain nombre de mutations génétiques qui modifient sa croissance normale ainsi que les processus qui maintiennent son homéostasie (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). Ces mutations agissent généralement au niveau de six grands axes qui protègent l'organisme contre le développement de cancers. Ces mutations qui transforment des gènes dits proto-oncogènes en oncogènes ou qui entraînent la surexpression de gènes à caractéristiques oncogéniques agissent souvent directement sur un ou plusieurs des grands axes présentés dans les paragraphes qui suivent. Ces grands axes peuvent également être dérégulés par des

mutations qui désactivent des gènes suppresseurs de tumeurs souvent responsables du contrôle de l'homéostasie.

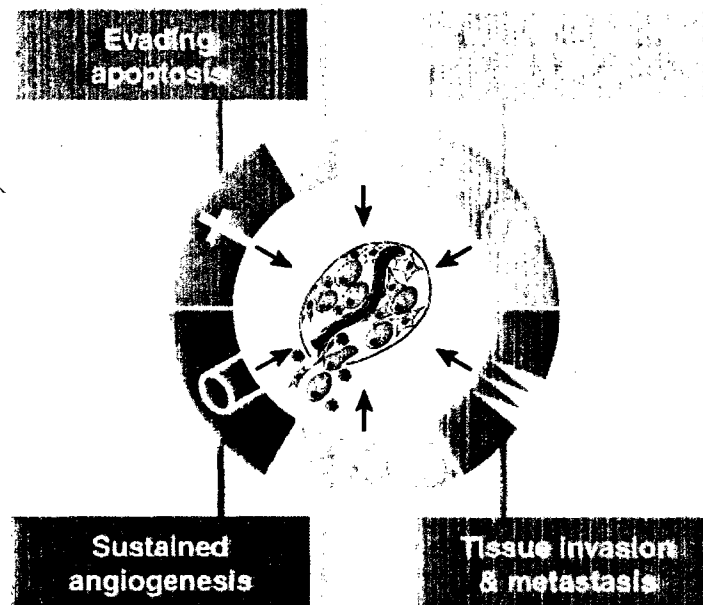


Figure 1 : Les six grandes caractéristiques habituellement nécessaires au développement d'un cancer

L'autosuffisance par rapport aux signaux de croissance (en vert), l'insensibilité face aux facteurs inhibiteurs de croissance (en jaune), la résistance à l'apoptose (en gris), l'immortalisation des cellules (en bleu), l'angiogénèse (en rouge) et l'invasion et la formation de métastase (en mauve) (Tiré de HANAHAN et WEINBERG, 2000).

1.1. Autosuffisance par rapport aux signaux de croissance

Chez un organisme normal, la croissance des cellules est contrôlée par des signaux de croissance. Ainsi, pour proliférer, les cellules doivent recevoir des signaux de croissance

qui se trouvent souvent dans le milieu extracellulaire. Ce sont les cellules elles-mêmes ou les cellules avoisinantes qui produisent ces signaux sous forme de molécules solubles (facteurs de croissance, morphogène) ou insolubles (élément de la matrice extracellulaire). Les signaux de croissance captés par une cellule sont ensuite transmis vers le milieu intracellulaire pour y être interprétés et apporter les changements requis (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). Lors du développement d'un cancer, les cellules développent souvent une autosuffisance par rapport à ces signaux de croissance. Cette autosuffisance peut être acquise à travers la formation de boucles autocrines ou à travers la surexpression des récepteurs de facteurs de croissance (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). Lors du développement de boucles autocrines, les cellules se mettent à sécréter des signaux de croissance afin de stimuler leurs propres récepteurs de croissance. Ces boucles autocrines permettent aux cellules de devenir plus indépendantes du milieu extracellulaire dans lequel elles se trouvent. Certaines protéines sécrétées par les cellules cancéreuses et qui participent à des boucles de prolifération sont d'ailleurs considérées des oncogènes. Le *platelet-derived growth factor* (PDGF) en est un exemple (HERMANSSON *et al.*, 1988). En ce qui a trait à la surexpression de récepteurs de croissance, elle permet d'amplifier la réponse des cellules aux signaux de croissance présents en concentration normale dans le milieu environnant. Comme c'était le cas pour les facteurs de croissance, certains récepteurs de croissance sont considérés comme des oncogènes. Les cellules cancéreuses peuvent également utiliser d'autres moyens afin d'obtenir leur indépendance des signaux de prolifération. Certains cancers expriment des récepteurs de croissance qui contiennent des mutations qui les rendent constitutivement actifs, et ce, même en l'absence de leur ligand. Même si le développement d'une indépendance aux facteurs de croissance confère un

avantage considérable aux cellules, cela ne suffit pas toujours au développement d'un cancer.

1.2. Insensibilité face aux facteurs inhibiteurs de croissance

Afin de maintenir et de mieux contrôler l'homéostasie cellulaire, des signaux inhibiteurs de croissance et de différenciation cellulaire existent parallèlement aux facteurs de croissances. La balance entre ces différents types de signaux permet à l'organisme de réguler étroitement l'homéostasie de la prolifération cellulaire. Encore une fois, ces signaux se retrouvent sous forme de molécules solubles ou insolubles retrouvées dans le milieu extracellulaire, au niveau des composantes de la matrice extracellulaire ou à la surface même des différentes cellules. Les molécules inhibitrices de la prolifération agissent généralement de deux façons : en encourageant les cellules à entrer en G0 (étape latente du cycle cellulaire) ou en poussant les cellules à se différencier en un type cellulaire qui ne prolifère plus (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000).

Les cellules cancéreuses deviennent souvent relativement insensibles aux différents signaux qui cherchent normalement à contrôler et à inhiber leur croissance. Cette insensibilité peut prendre plusieurs formes. Ainsi, de nombreuses cellules cancéreuses possèdent des gènes suppresseurs de tumeur inactivés ou mutés qui ne sont plus en mesure de contrôler ou d'arrêter le cycle cellulaire à des étapes spécifiques comme ce serait normalement le cas. La protéine du rétinoblastome (pRb) est un exemple concret de ce phénomène. Cette protéine est un suppresseur de tumeur qui régule négativement le cycle cellulaire en

inhibant l'expression de gènes nécessaires à la phase S du cycle cellulaire (WEINBERG, 1995). Les cellules cancéreuses peuvent avoir recourt à plusieurs différentes stratégies pour empêcher un gène suppresseur de tumeur de remplir ses fonctions habituelles. Des mutations ou des délétions génomiques peuvent entraîner la perte de l'expression de la protéine ou son inactivation. Chez certaines cellules cancéreuses, la résistance aux facteurs inhibiteurs de croissance passe par des modifications au niveau des récepteurs de ces signaux. On retrouve ainsi des cellules dont l'expression de certains récepteurs a été fortement diminuée ou des récepteurs mutés inactifs. Les modifications cellulaires qui entraînent la résistance aux facteurs inhibiteurs de croissance agissent parfois de façon indirecte tout en gardant le même impacte global. Par exemple, une diminution de l'expression des récepteurs membranaires du *transforming growth factor* β (TGF β), une protéine qui aide à maintenir l'activité pRb, peut simuler une perte d'expression de pRb ou une mutation qui entraîne une perte de fonction (MARKOWITZ *et al.*, 1995). Bien que l'inactivation ou la perte d'une protéine puisse entraîner des effets incontournables au niveau de la réponse aux facteurs inhibiteurs de croissance, des changements moins drastiques peuvent également avoir des effets similaires. Des modifications dans le patron d'expression de certaines familles de protéines en sont un exemple. De telles modifications peuvent être observées au niveau de certaines molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules telles que les intégrines (SHIELD *et al.*, 2007). La concentration des protéines inhibitrices de croissance se voit alors diminuée au profit des protéines qui détiennent des fonctions qui favorisent la croissance et la prolifération des cellules (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000; SHIELD *et al.*, 2007).

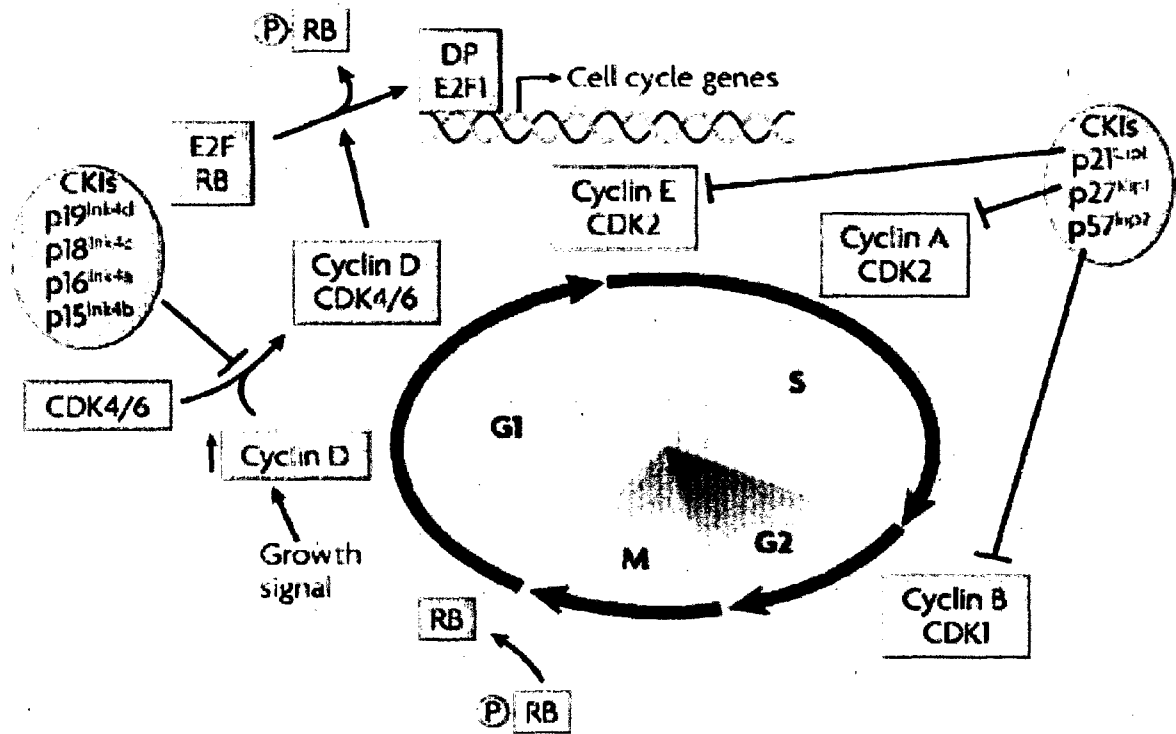


Figure 2 : Les quatre étapes du cycle cellulaire et quelques protéines régulatrices de celui-ci
 G1 (première étape de croissance), S (l'étape de la réplication de l'ADN), G2 (deuxième étape de croissance) et la phase M (l'étape de la mitose cellulaire). Plusieurs protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont également incluses illustrées (Tiré de HERRUP et YANG, 2007)

1.3. Résistance à l'apoptose

Comme mentionné dans les sections précédentes, les facteurs de croissances, les facteurs inhibiteurs de croissance et la différenciation cellulaire peuvent contrôler la prolifération des cellules. Toutefois, il est maintenant évident que la densité et la vitesse de croissance des cellules ne sont pas seulement dépendantes de la prolifération de ces dernières. Un

autre facteur important qui influence la croissance d'une population de cellules est leur susceptibilité à l'apoptose. L'apoptose est un processus naturel de mort cellulaire présent chez toutes les cellules. Lors du développement d'un cancer, on retrouve fréquemment une ou plusieurs mutations ou variations d'expression qui affectent la capacité des cellules à entrer en apoptose (LOWE et LIN, 2000). La résistance à l'apoptose est d'ailleurs l'une des caractéristiques des cellules cancéreuses les plus connues. Pour développer cette résistance, deux voies peuvent être exploitées par les cellules cancéreuses. D'un côté, les cellules peuvent devenir résistantes aux différents signaux extracellulaires ou intracellulaires qui visent à induire l'apoptose. De l'autre côté, les cellules peuvent développer des mutations ou inhiber l'expression de gènes impliqués directement dans la cascade apoptotique et inhiber celle-ci. Encore une fois, de nombreux oncogènes connus agissent directement au niveau de l'apoptose. L'un des plus connus est l'oncogène Bcl-2, une protéine avec des fonctions anti-apoptotiques qui encourage ainsi la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses (VAUX *et al.*, 1988). La résistance à l'apoptose facilite également l'apport de nouvelles mutations génétiques. En effet, l'un des rôles de p53, un suppresseur de tumeur inactivé ou muté dans un grand nombre de cancers, est d'induire l'apoptose lorsque le génome de la cellule devient trop endommagé ou lorsque la cellule est en présence d'instabilité génomique (LOWE et LIN, 2000; LOWE *et al.*, 1993; KARLSEDER *et al.*, 1999). En l'absence d'un p53 fonctionnel, les cellules deviennent plus susceptibles à l'apparition de mutations qui peuvent favoriser le développement de cancers (ZIEGLER *et al.*, 1994).

1.4. L'immortalisation des cellules

Dès leur naissance, les cellules somatiques normales sont limitées dans le nombre de division cellulaire qu'elles peuvent effectuer avant de cesser leur prolifération et d'entrer en sénescence. L'un des facteurs déterminant du vieillissement des cellules somatiques est le raccourcissement graduel des télomères qui se produit à chaque division cellulaire (HARLEY, 1991). Une cellule normale peut se diviser un maximum de 40 à 60 fois (HAYFLICK, 2000) et ce, indépendamment des signaux de survie pouvant être reçus des cellules adjacentes ou du milieu environnant (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). Pour qu'une tumeur puisse se développer, les cellules précancéreuses acquièrent des mutations génétiques qui leurs permettent de se diviser indéfiniment. L'inactivation de certains suppresseurs de tumeur entraîne parfois la protection des cellules cancéreuses de la sénescence. L'activation de la télomérase est un autre facteur présent chez la majorité des cellules cancéreuses (KIM *et al.*, 1994). Cette activation permet de maintenir la longueur des télomères au dessus du point critique qui normalement marquerait l'entrée de cellules en sénescence (KIM *et al.*, 1994). Près de 80 à 90% des cellules cancéreuses arrivent à maintenir la longueur de leurs télomères en surexprimant l'enzyme de la télomérase (SHAY et BACCHETTI, 1997). Bien que la télomérase semble jouer un rôle clef dans l'immortalisation des cellules cancéreuses, d'autres mutations ou surexpression pourraient également jouer des rôles similaires ou agir conjointement avec l'activation de la télomérase afin d'immortaliser les cellules (REDDEL, 1998).

1.5. L'angiogénèse

Pour survivre, toutes les cellules qu'elles soient cancéreuses ou normales ont besoin d'un apport fiable en nutriment. Le processus de l'angiogénèse est étroitement contrôlé par des facteurs pro-angiogéniques et par des facteurs anti-angiogéniques (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). Ce processus est d'une importance capitale pour le développement de nouveaux tissus en permettant l'apport en nourriture aux cellules. Les tumeurs cancéreuses ne font pas exception à la règle. Pour qu'une tumeur solide se développe et atteigne une taille supérieure à 2-3 mm de diamètre, elle doit obligatoirement stimuler le processus d'angiogénèse afin d'assurer son approvisionnement en oxygène et autres éléments essentiels à son développement (GIMBRONE *et al.*, 1972). La capacité de stimuler l'angiogénèse apparaît souvent au niveau des lésions préneoplasiques soit, avant même le développement d'une tumeur (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). Afin de promouvoir l'angiogénèse, les tumeurs cancéreuses utilisent plusieurs stratégies ou combinaison de stratégies pour renverser la délicate homéostasie entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Ainsi, certaines tumeurs sont en mesure de surexprimer des facteurs qui stimulent l'angiogénèse tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et le *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Dans le même ordre d'idée, les tumeurs peuvent également sous exprimer des protéines inhibitrices de l'angiogénèse comme la thrombospondin-1 (FOLKMAN, 2006; WATNICK *et al.*, 2003). D'autres tumeurs encore arrivent à mobiliser des protéines qui favorisent l'angiogénèse en provenance de la matrice extracellulaire. Également, certaines tumeurs recrutent des cellules du système immunitaire comme les macrophages qui sécrètent des protéines pro-angiogéniques afin promouvoir leur

vascularisation (SIERRA *et al.*, 2008). Bien que les processus qui mènent à la variation de la sécrétion de différents facteurs qui contrôlent l'angiogénèse demeurent en partie méconnus, l'inactivation de certains suppresseurs de tumeurs ainsi que l'apparition de certains oncogènes peut faire varier l'expression de facteurs reliés au contrôle de l'angiogénèse (RAK *et al.*, 1995; DAMERON *et al.*, 1994).

1.6. L'invasion et la formation de métastase

La mortalité associée aux différents cancers peut être reliée, dans la majorité des cas, à la formation de métastases (SIMPSON *et al.*, 2008; GUPTA et MASSAGUÉ, 2006). Heureusement, le processus de formation de métastases est un processus relativement peu efficace et les cellules cancéreuses doivent franchir de nombreux obstacles avant de réussir à s'implanter à de nouveaux endroits (POSTE et FIDLER, 1979). Parmi ses obstacles, on retrouve l'anoïkose. L'anoïkose est en fait une forme d'apoptose qui survient chez les cellules lors de l'absence d'ancrage (FRISCH et FRANCIS, 1994). Puisque l'anoïkose emprunte des voies de signalisation qui convergent avec celles de l'apoptose, une augmentation de la résistance à l'apoptose chez les cellules cancéreuses augmente souvent les chances de ces dernières de survivre à l'anoïkose. La résistance accrue à l'anoïkose est importante lorsque les cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire et qu'elles entrent dans le système sanguin ou lymphatique dans le but de former des métastases distantes de la tumeur primaire (NIKIFOROV *et al.*, 1996). Une cellule en mesure de former des métastases présente aussi des différences au niveau de ses propriétés d'adhésion cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (JOHNSON, 1991). Ces nouvelles

propriétés d'adhésion peuvent entre autre permettre à la cellule cancéreuse de se détacher de la tumeur primaire et d'adhérer à un tissu ou à un organe éloigné afin de s'y implanter. Une autre caractéristique des cellules métastatiques est leur habilité à exprimer des protéines qui permettent la dégradation de composantes de la matrice extracellulaire (SHIELD *et al.*, 2007). Ceci permet aux cellules d'envahir des tissus ou des organes et d'y former des métastases potentiellement létales (COUSSENS et WERB, 1996). La capacité de migration est une autre caractéristique importante des cellules cancéreuses qui cherchent à former des métastases (GUPTA et MASSAGUÉ, 2006). La capacité de migration des cellules cancéreuses est particulièrement importante lors de l'entrée et de la sortie de ces cellules du système circulatoire emprunté soit lors de l'intravasation et lors de l'extravasation. Ces étapes requièrent généralement des modifications dans l'expression de certaines protéines chez les cellules. Ainsi, chez les cellules épithéliales, le phénomène d'intravasation est souvent précédé d'une diminution de l'expression de la E-cadhérine, d'une augmentation de l'expression de la N-cadhérine, d'une transition épithélio-mésenchymateuse et de l'expression de molécules pouvant dégrader la matrice extracellulaire (YILMAZ et CHRISTOFORI, 2009). Ces modifications, permettent aux cellules de quitter la tumeur primaire et de migrer vers un système circulatoire en dégradant les éléments de la matrice extracellulaire qui pourraient leurs faire obstacle. Lors de l'extravasation, l'adhésion rapide des cellules se trouvant dans le système circulatoire devient essentielle. Cette adhésion dépend tout d'abord de certaines intégrines exprimées par les cellules cancéreuses et de la E-sélectine des cellules endothéliales. Par la suite, une adhésion plus solide des cellules véhiculée par les intégrines et des molécules de la famille des immunoglobulines telles que la VCAM-1 permet aux cellules d'entreprendre l'extravasation (ZETTER, 1993). La sélection *in vivo* qui survient à toutes les étapes du

processus de formation de métastases encourage l'hétérogénéité des cellules cancéreuses et favorise souvent le développement de foyers de cellules cancéreuses moins sensibles aux différents traitements thérapeutiques pouvant être utilisés (FIDLER, 1990).

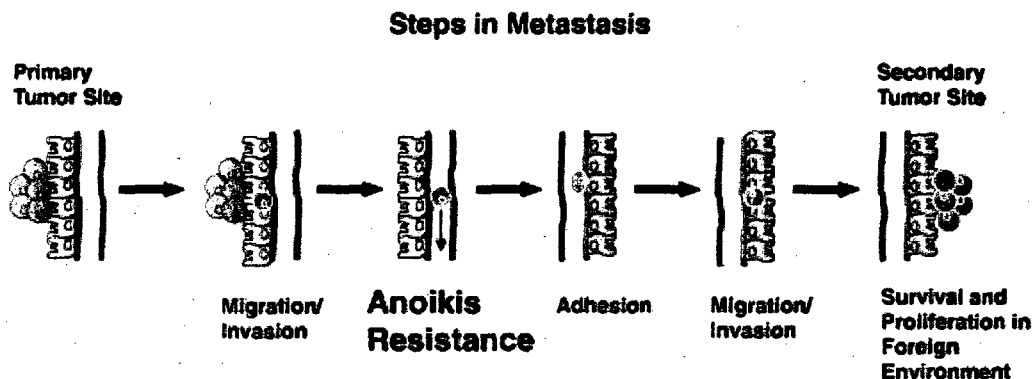
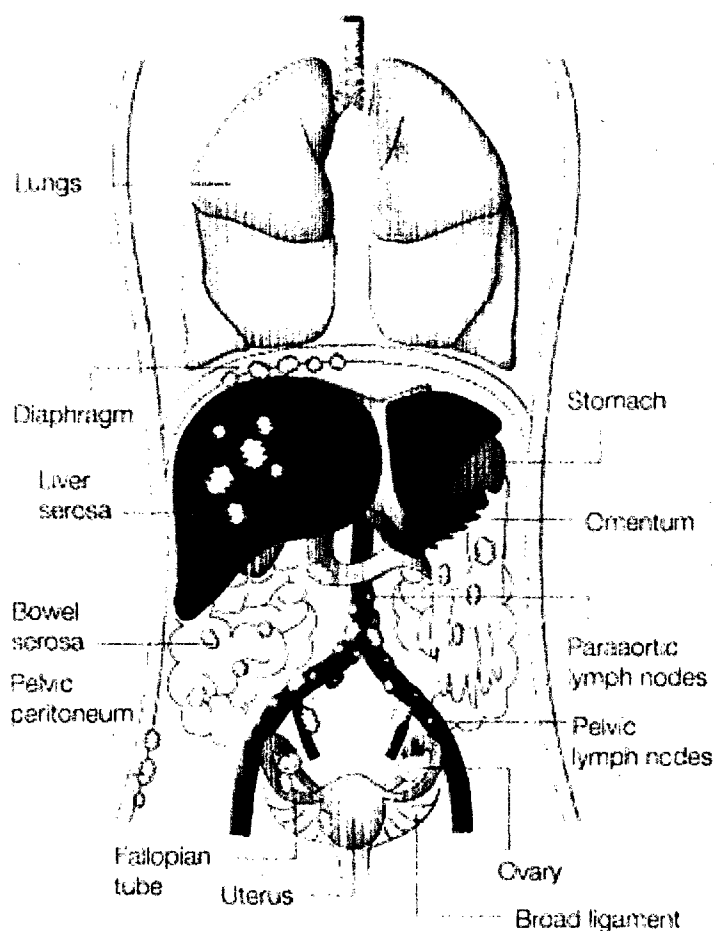


Figure 3 : Les étapes associées à la formation de métastases

Des cellules se détachent de la tumeur primaire et migrent vers le système lymphatique ou sanguin (intravasation). Les cellules ayant développé une résistance à l'anoikose arrivent à survivre lors de leur parcours dans le système lymphatique ou sanguin. Les cellules cancéreuses adhèrent à une paroi distante de la tumeur primaire et migrent hors du système circulatoire emprunté (extravasation). Les cellules implantées dans leur nouveau milieu y prolifèrent et l'envahissent pour former des métastases (Tirée de SIMPSON *et al.*, 2008)

Le cancer de l'ovaire possède un processus de formation de métastases relativement unique. Toutefois, les différentes caractéristiques associées aux cellules cancéreuses capables de former des métastases demeurent globalement les mêmes. Contrairement aux autres cancers, le cancer de l'ovaire n'emprunte que rarement le système sanguin ou lymphatique lors de sa dissémination. La formation de métastases chez ce cancer passe plutôt par le relâchement d'agrégats de cellules cancéreuses en provenance de la tumeur primaire dans le liquide intrapéritonéale et ainsi par la formation d'ascite (NAORA et MONTELL, 2005). Les agrégats de cellules forment alors des sphéroïdes qui sont libres de s'implanter au

niveau des cellules mésothéliales qui recouvrent le péritoine et d'y former des métastases. La formation de sphéroïdes favorise la dissémination du cancer de l'ovaire de différentes façons. La formation de sphéroïdes représente une solution simple au problème que représente l'anoïkose lors de la dissémination du cancer. Les interactions cellule-cellule retrouvées à même les sphéroïdes pourraient en effet remplacer temporairement les signaux de survie habituellement fournis par la matrice extracellulaire. Les sphéroïdes expriment d'ailleurs des patrons de protéines d'adhésion différents de ceux retrouvés chez les cellules normales ou même de ceux retrouvés chez les cellules qui composent la tumeur primaire. Une prolifération, bien que modérée par rapport à leurs contreparties ancrées sur de la matrice extracellulaire, a même été observée chez les cellules qui forment les sphéroïdes. Les sphéroïdes peuvent également être formées de différents types de cellules (SHIELD *et al.*, 2007). Il est donc possible que cette hétérogénéité de cellules permette à certaines cellules présentes au niveau d'un sphéroïde de déployer certaines fonctions au moment opportun afin de former des métastases. Finalement, il a été démontré que les sphéroïdes sont en mesure de sécréter certaines protéines essentielles à l'invasion des cellules mésothéliales qui recouvrent le péritoine et des organes sous-jacents (SHIELD *et al.*, 2007).



Nature Reviews | Cancer

Figure 4 : Le patron de formation de métastases du cancer de l'ovaire

Des agrégats de cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire de l'ovaire et se répandent dans le liquide intrapéritonéal sous forme de sphéroïdes. Les sphéroïdes se dispersent librement dans la cavité intrapéritonéale et certaines adhèrent aux cellules mésothéliales qui recouvrent le péritoine. Une fois adhérentes, les cellules cancéreuses envahissent les tissus ou organes à proximité et forment des métastases (Tirée de SHIELD *et al.*, 2005).

2. Le cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est souvent caractérisé par un mauvais pronostic. Au Canada, près de 2 200 nouveaux cas de cancers ovariens sont diagnostiqués chaque année. Le cancer de

l'ovaire est actuellement le cancer gynécologique le plus mortel et la cinquième cause de mortalité par cancer chez les femmes. Le pourcentage de survie après 5 ans a été évalué à 40% (Canadian Cancer Statistics, 2008), cependant ce taux chute drastiquement après 6 ans pour devenir presque nul (DUBOIS *et al.*, 2003). La forte mortalité associée à ce cancer est en grande partie reliée au fait que les stades précoces de la maladie sont asymptomatiques. Ainsi, les cancers ovariens sont souvent diagnostiqués à des stades avancés de la maladie (LANDEN *et al.*, 2008). Chez près de 75% des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, la maladie a déjà formée des métastases au moment du diagnostique (BAST *et al.*, 1998). En plus des métastases, on observe souvent la présence du liquide intrapéritonéal qui comprend des sphéroïdes de cellules cancéreuses que l'on appelle ascite chez les femmes atteintes de ce cancer (COLOMBO *et al.*, 2006). Le développement d'outils de diagnostics précoces et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques sont importants pour pouvoir combattre efficacement cette maladie.

2.1 Le développement d'un cancer de l'ovaire

Plusieurs facteurs augmentent les chances de développer un cancer de l'ovaire. Par exemple, l'incidence de ce cancer augmente avec l'âge (COLOMBO *et al.*, 2006). Également, une prédisposition génétique à ce type de cancer est présente chez 5 à 10% des patientes qui le développent (COLOMBO *et al.*, 2006). Cette prédisposition génétique est souvent traduite par des mutations au niveau des gènes BRCA1 et BRCA2 (ANTONIOU *et al.*, 2003). Ainsi, les risques de développer un cancer de l'ovaire serait de 40% chez les

porteuses d'un gène BRCA1 muté et de 10% chez les porteuses d'un gène BRCA2 muté (ALETTI *et al.*, 2007; ANTONIOU *et al.*, 2003).

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer quels facteurs initieraient le développement de la maladie. Selon l'hypothèse de Fathalla en 1971, le processus d'ovulation abîmerait les cellules épithéliales de l'ovaire et les prédisposeraient à l'accumulation de mutations génétiques qui pourraient mener au développement d'un cancer (FATHALLA, 1971). Cette hypothèse est appuyée par le fait que la diminution du nombre de cycle menstruel, les grossesses, la lactation et l'utilisation de contraceptifs oraux sont tous des facteurs qui entraînent une diminution du risque de développer un cancer de l'ovaire (WHITTMORE *et al.*, 1992).

Une deuxième hypothèse implique les kystes d'inclusion dont l'abondance augmente avec l'âge. Les kystes d'inclusion sont des capsules fermées qui se retrouvent à la surface ou à l'intérieure de l'ovaire. Ils seraient vraisemblablement formés lors de la réparation rapide de la surface de l'ovaire suite à une ovulation (AUERSPERG *et al.*, 2001). Comme à la surface d'un ovaire normal, on retrouve une monocouche de cellules épithéliales à l'intérieure des kystes d'inclusion. Comparativement aux cellules épithéliales à la surface des ovaires, on retrouve souvent chez les cellules épithéliales des kystes d'inclusion des phénotypes altérés qui semblent indiquer une transition vers un état métaplasique. À ce moment, il n'est pas rare que les cellules expriment des marqueurs retrouvés au niveau des néoplasmes de l'ovaire tel E-cadhérine et CA125 (AUERSPERG *et al.*, 2001). Des néoplasmes de l'ovaire sont d'ailleurs retrouvés plus fréquemment au niveau des kystes d'inclusion qu'à la surface des ovaires (DELIGDISCH *et al.*, 1995). Bien que la raison

pour laquelle les néoplasmes sont plus fréquemment retrouvés dans les kystes d'inclusion demeure inconnue, quelques hypothèses ont été avancées. Ainsi, il est possible que le développement de néoplasmes soit encouragé par la stimulation autocrine des cellules épithéliales qui s'y trouvent (AUERSPERG *et al.*, 2001). En effet, les cytokines et les hormones sécrétées par ces cellules demeurent prisonnières des kystes d'inclusion et y sont ainsi concentrées (WU *et al.*, 1993). Certaines cytokines telles que le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) peuvent agir indirectement comme agent mutagène chez de nombreux types de cellules et pourraient encourager ainsi l'accumulation de mutations et le développement de néoplasmes (YAN *et al.*, 2006). Également, les cellules épithéliales de l'ovaire (OSE) des kystes d'inclusion ne sont pas séparées du stroma par la tunica albuginea. Cette particularité fait en sorte que ces cellules sont plus exposées aux différents facteurs de croissances et cytokines sécrétés par les cellules stromales ainsi qu'aux différents agents bioactifs retrouvés dans le sang. Cette exposition accrue à des agents divers pourrait promouvoir le développement de néoplasmes (AUERSPERG *et al.*, 2001).

2.2 Les cellules épithéliales de l'ovaire

Il existe plusieurs types et sous types de cancers de l'ovaire qui diffèrent par le genre de cellule à la base du développement de la tumeur d'origine. Environ 90% des cancers ovariens se développent à partir des cellules épithéliales de l'ovaire (ALETTI *et al.*, 2007; COLOMBO *et al.*, 2006). Ainsi, lorsqu'on parle du cancer de l'ovaire, on fait généralement référence au cancer épithélial de l'ovaire.

L'épithélium de l'ovaire est formé d'une couche unique de cellules épithéliales qui ne représente que 1% de l'ovaire normal (OKAMURA *et al.*, 2006). L'épithélium de l'ovaire est en fait une continuité du mésothélium péritonéal (OKAMURA *et al.*, 2006). Pendant bien des années, les cellules épithéliales de l'ovaire ont été ignorées par la communauté scientifique puisqu'elles ne représentaient qu'une infime portion de l'ovaire en générale. En fait, certains croyaient même que ces cellules n'étaient pas présentes chez toutes les femmes. Cette croyance erronée vient du fait que les cellules épithéliales qui recouvrent l'ovaire s'en détachent très facilement et donc, qu'il n'est pas rare de retrouver des ovaires dépourvus de leur épithélium à la suite de certaines interventions chirurgicales (AUERSPERG *et al.*, 2001). Les cellules épithéliales de l'ovaire présentent quelques particularités qui les différencient des autres cellules épithéliales. Contrairement à la plupart des épithéliums, l'épithélium de l'ovaire n'exprime pas E-cadhérine mais plutôt N-cadhérine (WONG *et al.*, 1999). N-cadhérine est une protéine généralement exprimée par les cellules mésenchymateuses (WHEELLOCK *et al.*, 2008). Son expression chez les cellules épithéliales de l'ovaire illustre la dualité mésenchymateuse et épithéliale de ces cellules. Le caractère mésenchymateux des cellules épithéliales de l'ovaire permet vraisemblablement à celles-ci de réagir adéquatement lors de l'ovulation.

Il existe plusieurs différences entre les cellules à caractéristiques épithéliales et les cellules à caractéristiques mésenchymateuses. Les cellules épithéliales se retrouvent sous forme de monocouche cellulaire et, lorsque placées en culture, elles ont tendance à pousser sous forme de plaques de cellules. Les interactions cellules-cellules sont très présentes chez les cellules épithéliales. Ainsi, on retrouve généralement chez ces cellules de nombreuses jonctions cellulaires telles que des desmosomes, des jonctions serrées, des jonctions

adhérentes et des jonctions communicantes. On retrouve également chez les cellules épithéliales une polarisation apicale et baso-latérale caractérisée par une distribution localisée de certaines molécules d'adhésions telles que les cadhérines et certaines intégrines. Les jonctions cellule-cellule observées chez les cellules épithéliales sont généralement regroupées sous forme d'une ceinture latérale qui fait le tour des cellules et les lie à ces voisines. Malgré la présence de nombreuses jonctions cellulaires, les cellules épithéliales sont en mesure de migrer. Cependant, cette migration se fait généralement à même la monocouche de cellules épithéliales dans laquelle la cellule se trouve (SCHÖCK et PERRIMON, 2002). Finalement, on observe souvent une polarisation du cytosquelette d'actine chez les cellules épithéliales, une expression de la E-cadhérine et l'expression de certaines cytokératines (THIERY et SLEEMAN, 2006).

Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules dites mésenchymateuses sont beaucoup plus indépendantes les unes des autres et ne forment pas de monocouche cellulaire polarisée comme les cellules épithéliales. Ainsi, lorsque mises en culture, les cellules mésenchymateuses prennent généralement une morphologie presque fibroblastique ou caractérisée par quelques extensions cellulaires. Les interactions cellules-cellules formées par les cellules mésenchymateuses sont généralement focalisées et donc beaucoup moins nombreuses que celles retrouvées chez les cellules épithéliales. La migration observée chez les cellules mésenchymateuses est généralement beaucoup plus importante que celle observée chez les cellules épithéliales. Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses peuvent migrer sous forme de chaînes ou individuellement. La migration de ces cellules se fait selon un processus d'extension, d'adhésion, de rétraction et de translocation ou en rampant comme le ferait une amibe (FRIEDL, 2004). Également, on

observe généralement une diminution ou une perte de l'expression de la E-cadhérine et des cytokératines chez les cellules dites mésenchymateuses. Finalement, l'expression de la vimentine, une protéine qui forme des filaments intermédiaires, est typiquement associée aux cellules dites mésenchymateuses (THIERY et SLEEMAN, 2006).

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) fait référence au processus par lequel des cellules épithéliales se convertissent en cellules mésenchymateuses (Figure 5). Les cellules qui effectuent cette transition perdent alors plusieurs de leurs caractéristiques épithéliales au profit des caractéristiques mésenchymateuses décrites lors du paragraphe précédent. Plusieurs facteurs extracellulaires peuvent entraîner une EMT dont certains facteurs de croissance (ex : le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), le facteur de croissance transformant- β (TGF- β), le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur fibroblastique de croissance (FGF)), certaines cytokines et certains éléments de la matrice extracellulaire (ex : le collagène et l'acide hyaluronique). La transition inverse, soit la transition mésenchymateuse-épithéliale (MET) existe également (ONG *et al.*, 2000). L'expression de la E-cadhérine, l'adhésion des cellules et les microfilaments d'actines peuvent induire la MET (THIERY et SLEEMAN, 2006; ONG *et al.*, 2000).

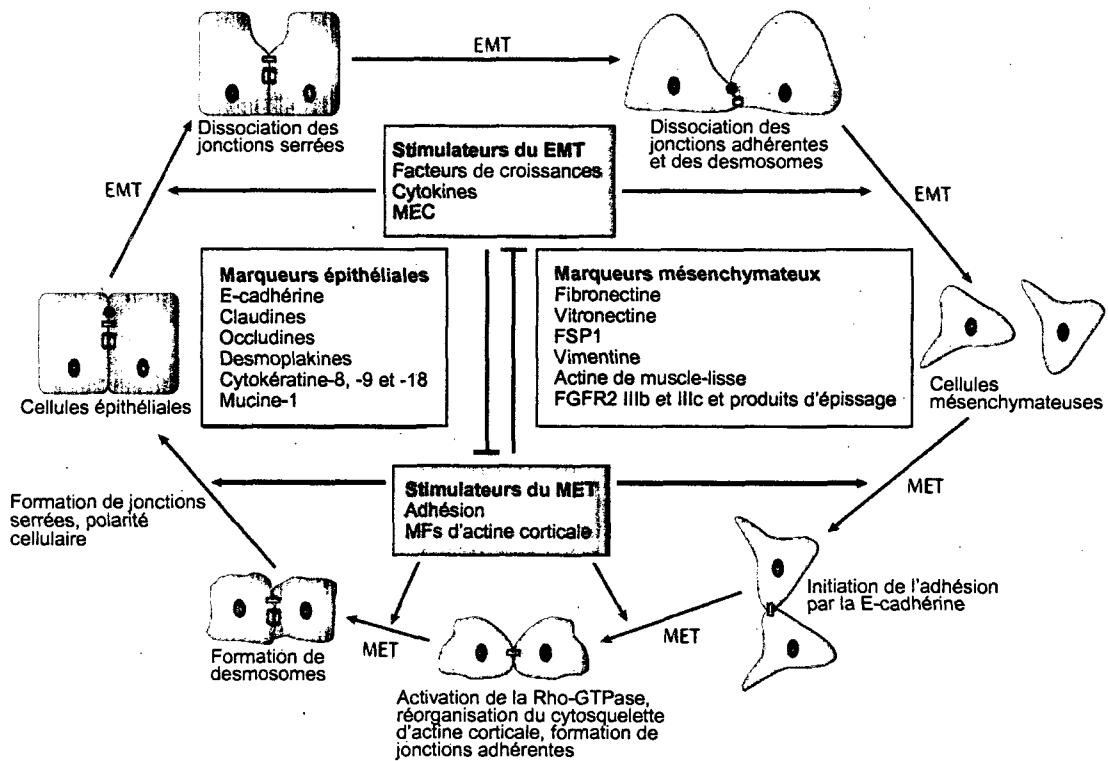


Figure 5 : Schéma des étapes associées à la transition épithélio-mésenchymateuse

Les étapes de la transition épithélio-mésenchymateuse sont décrites. Il est à noter que, comme le démontre le schéma, le processus inverse de cette transition est également possible chez les cellules. Les modifications cellulaires entraînées par ces transitions sont indiquées dans le schéma. Certains facteurs pouvant initier ces transitions sont également indiqués. Liste des abréviations : EMT = transition épithélio-mésenchymateuse, MET = transition mésenchymateuse-épithéliale, MEC = matrice extracellulaire, FGFR2 = Fibroblast growth factor receptor-2, FSP1 = protéine spécifique des fibroblastes-1, MFs = microfilaments (modifiée de THIERY et SLEEMAN, 2006)

Dans leur forme plus épithéliale, les OSE ont une morphologie qualifiée de squameuse à cuboïdale (figure 5 et figure 6). Lorsque ces cellules effectuent une EMT, elles adoptent une morphologie plus fibroblastique (figure 5 et figure 6). La EMT tient une importance particulière lors de l'ovulation, les OSE désertent alors la surface du follicule d'ovulation avant sa rupture et participent ensuite à sa réparation après l'ovulation (AUERSPERG *et al.*, 2001; KRUK *et al.*, 1994). La réparation de la surface de l'ovaire est alors facilitée par

la EMT qui survient juste avant l'ovulation et à la suite de celle-ci (AUERSPERG *et al.*, 2001). Cette transition est caractérisée par un changement de morphologie et permet aux cellules d'augmenter leur motilité, de modifier leur capacité de prolifération et les rend plus contractiles. Les cellules devenues mésenchymateuses sont également en mesure de modifier la matrice extracellulaire en sécrétant de la laminine et du collagène de type IV (AUERSPERG *et al.*, 2001; KRUK *et al.*, 1994). Les modifications apportées à la matrice extracellulaire par les cellules mésenchymateuses permettent aux cellules de modifier les potentiels de signalisation provenant des interactions cellule-matrice extracellulaire.

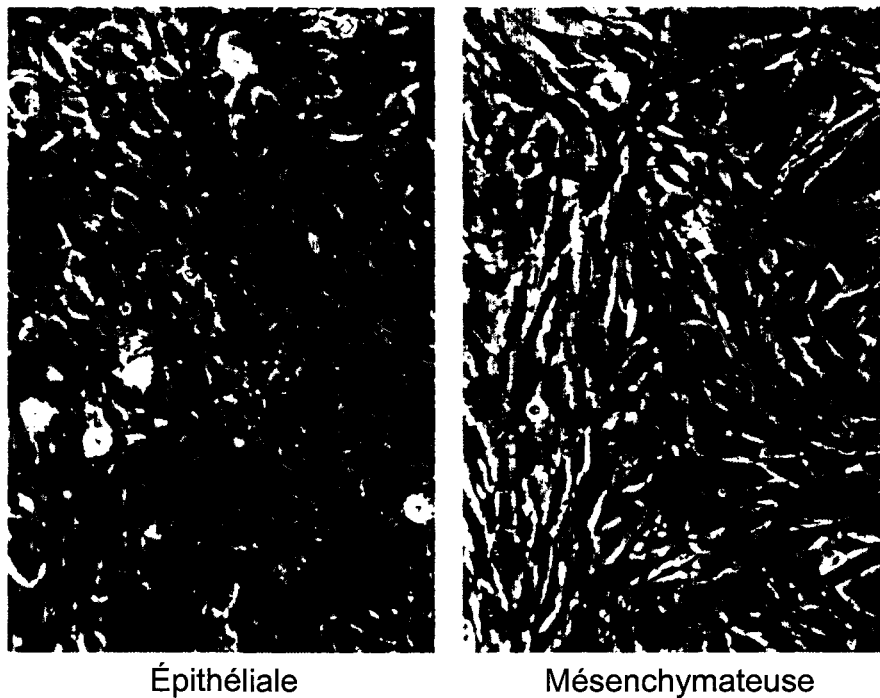


Figure 6 : Morphologie des OSE

Les OSE en culture commencent sous leur forme épithéliale (passage 1) puis font une EMT et adoptent des caractéristiques et une morphologie mésenchymateuse (passage 5). Photos prises à 200X. (Modifiée de AUERSPERG *et al.*, 2001)

Lors de la transformation de OSE en cellules cancéreuses se sont les caractéristiques épithéliales des cellules qui sont favorisées. Ainsi, dans la majorité des cas, les cellules cancéreuses provenant des cancers de l'ovaire possèdent une morphologie épithéliale (AUERSPERG *et al.*, 2001).

2.3. Suivi et traitement des cancers de l'ovaire

Chez plus de 80% des cancers épithéliaux de l'ovaire, on observe une augmentation sérique d'un antigène tumoral nommé CA125 (BAST *et al.*, 1983). La concentration sérique de cet antigène tumoral n'est élevée que chez 1% de la population générale, 6% des femmes avec une maladie bénigne et 28,5% des femmes porteuses de cancers non gynécologiques (BAST *et al.*, 1983). Actuellement, cette protéine est l'un des outils utilisés afin de suivre la progression du cancer de l'ovaire, de suivre la réponse du cancer aux traitements utilisés et afin de détecter rapidement les rechutes de la maladie (ALETTI *et al.*, 2007). CA125 est exprimé à la surface de la pleura, du péricarde et du péritoine ainsi qu'à la surface des épithéliums oviductaux, endométriaux et endocervicaux (AUERSPERG *et al.*, 2001). L'épithélium normal à la surface de l'ovaire n'exprime pas cette protéine (AUERSPERG *et al.*, 2001). Cependant, plus de 80% des cancers épithéliaux de l'ovaire expriment CA125 (COLOMBO *et al.*, 2006; BAST *et al.*, 1983). Les propriétés et caractéristiques connues de cette protéine seront décrites plus en détail dans les pages qui suivent.

Le traitement des cancers de l'ovaire consiste généralement en une chirurgie agressive combinée avec de la chimiothérapie (OZOLS, 2002). Lors de la chirurgie, on procède

généralement à l'ablation de l'un ou des deux ovaires atteints et des tissus adjacents qui pourraient être touchés dont les trompes de Fallope, l'utérus, certains ganglions lymphatiques, etc. Après la chirurgie, on procède généralement à des traitements de chimiothérapie. Actuellement, une combinaison de carboplatin (un parent du cisplatine) et de taxane (comme le taxol, aussi appelé paclitaxel) est généralement employée (PICCART *et al.*, 2000; DUBOIS *et al.*, 2003). L'avantage de combiner ces deux agents tient de leurs différentes cibles au niveau cellules cancéreuses. Ainsi, le carboplatin vise à endommager l'ADN alors que le paclitaxel agit plutôt au niveau des microtubules et fait obstacle directement à la mitose cellulaire. Cette combinaison de traitement offre généralement de bons résultats alors que la plupart des patientes parviennent à une rémission clinique (OZOLS, 2002).

Malheureusement, la majorité des patientes diagnostiquées avec le cancer de l'ovaire font une rechute après un temps médian qui varie entre 18 et 24 mois (OZOLS, 2002). Les traitements utilisés prennent alors la forme de traitements palliatifs puisque les nouvelles tumeurs sont souvent résistantes aux traitements chimiothérapeutiques ou le deviennent rapidement (OZOLS, 2002; ALETTI *et al.*, 2007).

3. La famille des mucines

Comme mentionné plus tôt, la protéine CA125 est souvent exprimée par les cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire. Puisque les cellules épithéliales de l'ovaire ne l'expriment pas, il est logique de se demander si son expression ne confère pas un avantage

aux cellules cancéreuses qui permettrait à celles-ci de former un cancer. Cependant, on ne connaît présentement que très peu de choses sur cette protéine. Ainsi, les paragraphes qui suivent résumeront les caractéristiques connues de la protéine et feront quelques parallèles à des protéines qui pourraient avoir des rôles similaires.

C'est en 1981 que l'équipe de Bast a généré l'anticorps OC125 à partir d'un cystadénocarcinome séreux humain devenu aujourd'hui la lignée cellulaire OVCA 433 (BAST *et al.*, 1981). Cet anticorps permettait la détection d'un antigène tumoral présent chez plus de 80% des tumeurs épithéliales de l'ovaire non-mucineuses (BAST *et al.*, 1981). Cet antigène tumoral a par la suite pris le nom de CA125.

CA125 est codé par le gène MUC16 et est une protéine de la famille des mucines (LLOYD *et al.*, 1997; YIN et LLOYD, 2001). Les mucines sont des protéines exprimées à la surface de cellules épithéliales souvent exposées à un environnement difficile. Elles ont souvent comme rôle de protéger les cellules en formant une barrière physique à leur surface. De plus, plusieurs mucines agissent en tant que censeurs du milieu extracellulaire et permettent la transmission de signaux du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Les mucines sont des protéines relativement difficiles à étudier à cause de leur grande taille (> 250 kDa) et de leurs nombreuses glycosylations (GENDLER *et al.*, 1987).

Toutes les mucines comprennent une région de répétitions en tandem. Cette région est généralement riche en sérine, thréonine et proline (GENDLER *et al.*, 1987). Les répétitions en tandem sont caractérisées par de nombreuses glycosylations en O- et en N- au niveau des

acides aminés de prolines, de sérines et d'asparagines (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Chaque répétition peut compter de 5 à 100 sites de glycosylation et une mucine peut contenir entre 5 et 500 répétitions en tandem (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004).

3.1. Les fonctions associées aux mucines

Les oligosaccharides qui glycosylent les mucines jouent un rôle important au niveau des fonctions de ces protéines. Les restrictions stériques qu'ils créent permettent en quelque sorte de filtrer les composantes du milieu extracellulaire. Par exemple, ils empêcheraient le passage de certaines macro-molécules et de microorganismes vers la cellule tout en permettant à d'autres molécules plus petites de passer (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Le réseau complexe d'oligosaccharides relié aux mucines pourrait également entraîner la séquestration et la concentration de facteurs de croissance, de cytokines, de chimiokines et d'autres molécules qui véhiculent différents signaux importants aux cellules (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). D'ailleurs, les cellules chez de nombreux types de cancer, en particulier les adénocarcinomes, se mettent à exprimer des mucines ou changent leur patron d'expression de celles-ci à la suite de leur transformation (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Ainsi, de nombreux anticorps qui reconnaissent des épitopes de mucines sont utilisés en clinique pour le diagnostic de différents cancers (BAST *et al.*, 1981; PATERSON *et al.*, 1986; MAGNANI *et al.*, 1983). C'est le cas de l'anticorps OC 125 qui reconnaît la mucine CA125, exprimée dans le cancer épithéliale de l'ovaire (BAST *et al.*, 1981). Les types d'oligosaccharides qui glycosylent

une mucine peuvent changer en fonction du tissu qui l'exprime ce qui rend ces protéines encore plus difficile à étudier (LAN *et al.*, 1990).

Les mucines sont divisées en deux grandes catégories : les mucines sécrétées et les mucines associées à la membrane dont fait parti CA125. La plupart des mucines sécrétées aident à former un mucus visqueux à la surface des cellules épithéliales. Parmi ce type de mucine, on retrouve MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 et MUC19 (DESSEYN *et al.*, 2008; SINGH et HOLLINGSWORTH, 2006). Les mucines associées à la membrane sont composées d'un grand domaine extracellulaire, d'un seul domaine transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique (SINGH et HOLLINGSWORTH, 2006). Les mucines MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16 et MUC17 font parties de cette catégorie (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004; DESSEYN *et al.*, 2008; SINGH et HOLLINGSWORTH, 2006). C'est le domaine extracellulaire de la protéine qui comprend la composante typiquement associée aux mucines, soit, les répétitions en tandem riches en sérines, thréonines et prolines et fortement glycosylées (DESSEYN *et al.*, 2008).

Les mucines associées à la membrane peuvent être relâchées par clivage protéolytique et sécrétées dans le milieu extracellulaire (SINGH et HOLLINGSWORTH, 2006). Plusieurs de ces mucines peuvent aussi être produites sous formes sécrétées par épissage alternatif (SINGH et HOLLINGSWORTH, 2006). Les mucines associées à la membrane agissent comme senseurs de l'environnement extracellulaire et permettraient la transmission de signaux provenant de celui-ci vers le milieu intracellulaire. Ces signaux sont transmis par

des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, le clivage protéolytique et, peut être aussi, d'autres modifications (SINGH et HOLLINGSWORTH, 2006).

3.2. Les mucines et le cancer

Les mucines pourraient avoir plusieurs rôles à jouer au niveau du développement et de la progression de cancers. Ainsi, comme elles le font pour les cellules épithéliales normales, les mucines pourraient protéger les cellules cancéreuses d'un milieu extracellulaire qui, à la base, n'est pas nécessairement propice à leur prolifération (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Les mucines pourraient donc protéger les cellules de différentes molécules toxiques comme des acides, des molécules cytotoxiques et même, dans certains cas, de certains agents chimiothérapeutiques. La capacité des mucines de filtrer les différentes composantes du milieu extracellulaire pourrait également permettre aux cellules de s'isoler des cellules du système immunitaire et des cellules stromales environnantes tout en capturant et en emmagasinant des molécules qui favorisent leur croissance (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). L'encombrement stérique associé aux mucines pourrait également gêner l'interaction de certaines protéines avec leur ligand membranaire (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004; CHATURVEDI *et al.*, 2007).

Il a été démontré que certaines mucines, notamment MUC1 et MUC4, sont en mesure d'augmenter la prolifération des cellules cancéreuses et d'influencer leur degré de différenciation (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004; CHATURVEDI *et al.*, 2007, TSUTSUMIDA *et al.*, 2006). Ces mêmes mucines semblent également jouer un rôle au

niveau de l'invasion et de la formation de métastases (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004; CHATURVEDI *et al.*, 2007). Comme mentionné lors des sections précédentes, la formation de métastases requiert que les cellules cancéreuses puissent se détacher de la tumeur primaire (grâce en partie à des protéines avec des fonctions anti-adhésives) et puissent par la suite adhérer et s'établir à un nouvel endroit (grâce en partie à des protéines avec des propriétés adhésives). Les mucines sont des protéines dont les caractéristiques répondent bien à ce besoin. En effet, les différents domaines retrouvés sur ces protéines peuvent avoir des fonctions anti-adhésives ou adhésives (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004). Elles pourraient donc jouer un rôle important au niveau de la dissémination et du développement de métastases. Les mucines pourraient également empêcher les cellules du système immunitaire de reconnaître et de détruire les cellules cancéreuses en formant un écran protecteur grâce à leur grande taille (HOLLINGSWORTH et SWANSON, 2004).

Ainsi, plusieurs mucines semblent posséder des fonctions qui peuvent favoriser le développement d'un cancer. MUC1 et MUC 4 seraient même suffisant pour induire la transformation de certaines cellules (LI *et al.*, 2003; DURAISAMY *et al.*, 2006; BAFNA *et al.*, 2008). Récemment, il a été démontré que la mucine MUC13 serait surexprimée au niveau des cancers de l'ovaire. Les mêmes recherches semblent aussi suggérer que cette mucine transmembranaire augmenterait la prolifération et la migration des cellules (CHAUHAN *et al.*, 2009). Toutefois, la mucine MUC2 semble avoir un effet opposé et agirait plutôt en tant que suppresseur de tumeur particulièrement dans le cancer colorectal (VELCICH *et al.*, 2002).

4. CA125/MUC16

Comparativement à MUC1 et à MUC4, on connaît actuellement très peu de choses sur la mucine MUC16 aussi appelée CA125. Elle a été découverte en 1981 par l'équipe de Bast *et al.* qui voulait trouver des antigènes tumoraux associés aux cancers de l'ovaire afin de s'en servir comme cible thérapeutique. C'est en développant des anticorps contre la lignée de cancer de l'ovaire OVCA433 qu'ils ont isolé l'anticorps OC125 et découvert la protéine détectée par celui-ci, CA125 (BAST *et al.*, 1981). CA125 est détectée chez plus de 80% des cancers épithéliaux non mucineux de l'ovaire avec une histologie dite séreuse, endométrioïde, à cellules claires ou indifférenciée (BAST *et al.*, 1981; KABAWAT *et al.*, 1983). Le fait que l'épithélium normal de l'ovaire n'exprime pas cette protéine pourrait indiquer qu'elle aurait un rôle à jouer au niveau du développement ou de la progression de la maladie (BAST *et al.*, 1981). Cependant, CA125 n'est pas exclusivement exprimé par les cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire. Plusieurs tissus du système reproductif et quelques uns à l'extérieur de celui-ci expriment également cette protéine (KABAWAT *et al.* 1983; NOUWEN *et al.*, 1986). De plus, comme le démontre le tableau 1, le cancer de l'ovaire n'est pas la seule maladie qui entraîne une augmentation sérique de CA125 (BAST *et al.*, 1998). Ainsi, certaines conditions bénignes peuvent entraîner une augmentation de la concentration de la protéine.

Autres cancers qui peuvent être caractérisées par un taux élevé de CA125
Carcinome de l'endomètre
Carcinome de l'endocervix
Carcinome des trompes de Fallope
Carcinome du pancréas
Carcinome du poumon
Carcinome du sein
Carcinome du colon
Carcinome paratesticulaire
Mésothéliome malin
Tératome immature
Lymphomes

Tableau 1 : Autres cancers qui peuvent être caractérisés par une augmentation de CA125
(Modifié de BAST *et al.*, 1998)

Bien que CA125 soit une protéine membranaire, ce sont généralement les niveaux sériques de la protéine qui sont évalués lors des examens cliniques (BAST *et al.*, 1983; BAST *et al.*, 1998). En effet, la portion extracellulaire de la protéine peut être clivée et relâchée dans le sérum extracellulaire. Cependant, le site de clivage de CA125, les protéines responsables de ce clivage et le mécanisme emprunté sont encore inconnus.

4.1. La structure et les domaines de CA125

CA125 est codé par le gène MUC16 qui se trouve sur le chromosome 19 p13.2 tel qu'illustré par la figure 7 (YIN *et al.*, 2002; KANEKO *et al.*, 2003). La grande taille de

cette protéine et ses nombreuses glycosylations rendent l'étude de cette protéine relativement difficile. Ainsi de nombreuses informations contradictoires sont présentement retrouvées dans la littérature.

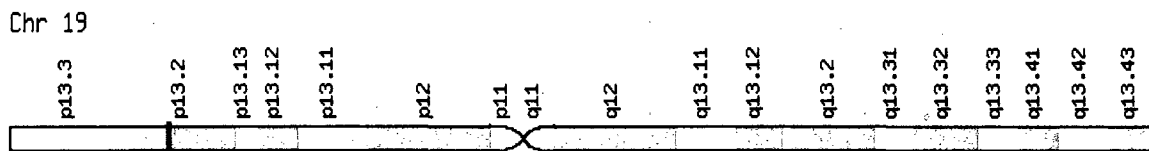


Figure 7 : Carte du chromosome 19

Emplacement du gène MUC16 qui code CA125 sur le chromosome 19 à la position p13.2. (Tirée de <http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc/index.shtml>).

Récemment, deux groupes de chercheurs ont réussi à cloner simultanément le cADN de CA125 permettant ainsi de clarifier certaines informations sur la protéine (YIN et LLOYD, 2001; O'BRIEN *et al.*, 2001). Comme mentionné plus tôt, CA125 est une glycoprotéine transmembranaire de type mucine dont le poids moléculaire excéderait 200 kDa et pourrait même aller jusqu'à 3,5 MDa (O'BRIEN *et al.*, 2002). Un pourcentage important du poids moléculaire de la protéine est relié à ses nombreuses glycosylations. Son récent clonage a permis de déterminer qu'elle est formée de trois grands domaines : le domaine carboxy terminal (C-terminal), le domaine des répétitions et le domaine amino terminal (N-terminal) (O'BRIEN *et al.*, 2001). Le domaine N-terminal est formé de plus de 12 000 acides aminés (O'BRIEN *et al.*, 2002). Ce domaine est riche en sérine, thréonine et proline et est fortement glycosylé en O et en N (O'BRIEN *et al.*, 2002; LLOYD *et al.*, 1997). Les nombreux hydrates de carbone de ce domaine ont probablement une influence sur la matrice extracellulaire des cellules qui expriment CA125. De plus, le domaine N-terminal

comprend une petite région de 74-120 acides aminés vraisemblablement dépourvue de glycosylation qui pourrait permettre des interactions protéine-protéine (O'BRIEN *et al.*, 2001). Le domaine des répétitions est un domaine extracellulaire qui se trouve entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal. Il comprend les répétitions en tandems qui sont typiquement retrouvées chez les protéines de la famille des mucines. Les anticorps OC125 et M11 utilisé pour détecter CA125 reconnaissent des épitopes qui se retrouvent au niveau de ces répétitions. Les répétitions en tandem sont répétées 7, 20 ou même plus de 60 fois selon l'isoforme de la protéine (O'BRIEN *et al.*, 2001; DORIGO et BEREK, 2007). Chaque répétition est formée de 156 acides aminés, est hautement conservée et comprend une méthionine et deux cystéines complètement conservées (O'BRIEN *et al.*, 2001). Les cystéines permettent la formation d'un pont disulfure au niveau de chaque répétition. Comme le domaine N terminal de la protéine, les répétitions en tandem de la protéine sont fortement O glycosylées et contiennent également quelques glycosylations en N.

Le domaine N-terminal et le domaine des répétitions représentent ensemble la majorité de la portion extracellulaire de la protéine et plus de 95% de la protéine totale. Les hydrates de carbone qui glycosylent ces domaines représentent approximativement 24%-28% de son poids total (DAVIS *et al.*, 1986). Celles-ci seraient principalement des glycosylations en O mais comprendrait aussi quelques glycosylations en N (LLOYD *et al.*, 1997; O'BRIEN *et al.*, 2002). Ces domaines contiennent également plusieurs domaines SEA (Sea Urchin Enterokinase) dont la fonction n'est pas encore bien compris (YIN et LLOYD, 2001; O'BRIEN *et al.*, 2001; MAEDA *et al.*, 2004).

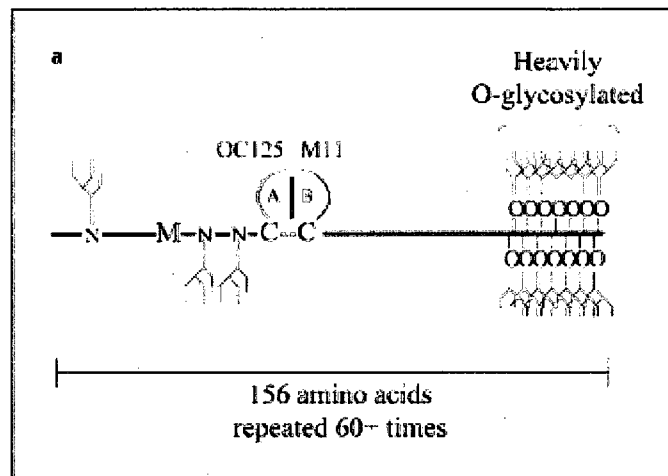


Figure 8 : Schématisation d'une répétition

Un schéma qui représente une répétition retrouvée au niveau du domaine des répétitions en tandem de la protéine CA125. On y retrouve une méthionine (M) et deux cystéines (C) complètement conservées d'une répétition à l'autre, quelques glycosylations en N, un domaine fortement glycosylé en O ainsi que les épitopes reconnus par les anticorps OC125 et M11. (Modifiée de O'BRIEN *et al.*, 2001).

La protéine comprend aussi un court domaine C-terminal qui est l'objet de cette étude. Celui-ci comprend lui-même une petite portion extracellulaire, une portion transmembranaire typique et une courte queue cytoplasmique. La portion extracellulaire de ce domaine ne comprend aucune homologie avec les autres domaines de la protéine et est donc communément appelée le domaine unique. Celui-ci comprend un site potentiel de clivage protéolytique juxtamembranaire (O'BRIEN *et al.*, 2001). Ce site, situé à 50 acides aminés en amont du domaine transmembranaire, pourrait être responsable du relâchement de la portion extracellulaire de la protéine dans le milieu extracellulaire. Le domaine C-terminal de la protéine comprend aussi une série de 25 acides aminés hydrophobes qui représenteraient vraisemblablement la portion transmembranaire de la protéine (YIN et LLOYD, 2001). La queue cytoplasmique de la protéine comprend 31 acides aminés (YIN

et LLOYD, 2001). On y retrouve six sites potentiels de phosphorylation soit : trois tyrosines, deux thréonines et une sérine (O'BRIEN *et al.*, 2001, YIN et LLOYD, 2001). Quelques articles ont d'ailleurs démontrés que la protéine peut être phosphorylée sur une sérine et/ou sur une thréonine (KONISHI *et al.*, 1994; FENDRICK *et al.*, 1997). Cette phosphorylation pourrait être responsable du relâchement de la portion extracellulaire de la protéine (FENDRICK *et al.*, 1997). La courte queue cytoplasmique de CA125 comprend aussi un motif d'acide aminé chargé positivement que l'on retrouve en position juxtamembranaire et qui est présent chez plusieurs autres mucines transmembranaires. Ce motif peut remplir plusieurs fonctions : un bon ancrage de la protéine à la membrane plasmique, un site potentiel de clivage enzymatique ou un signal imparfait de localisation nucléaire (SINGH et HOLLINGSWORTH, 2006). Le motif retrouvé chez CA125 (RRRKK) est semblable à celui retrouvé chez la mucine MUC1 (RRK), une mucine dont la translocation nucléaire a déjà été observée (WEN *et al.*, 2003).

```

21901 tmdsvlvtvk alfssnldps lveqvflpkt lnasfhwlg tyqlvdihvt emessvyqpt
21961 sssstqhfyl nftitnlpys qdkaqpgttn yqrnkried alnqlfrnss iksyfsdcqv
22021 stfrsvpnrh htgvdslcnf s[REDACTED]rv aiyeeflrmt rngtqlqnf ldrssvlvdg
22081 yspnrneplt gnsdlpfwav iliglagllg litcligvl vt[REDACTED]rrrkkeg eynvqqqcpq
22141 y[REDACTED]hldled lq

```

Figure 9 : Séquence du domaine C-terminal de CA125

Séquence en acide aminé du domaine C-terminal de la protéine CA125. On y retrouve en rouge le site potentiel de clivage protéolytique, en gris le domaine transmembranaire, en bleu les acides aminés susceptibles d'être phosphorylés et en jaune le motif d'acide aminé chargé positivement.

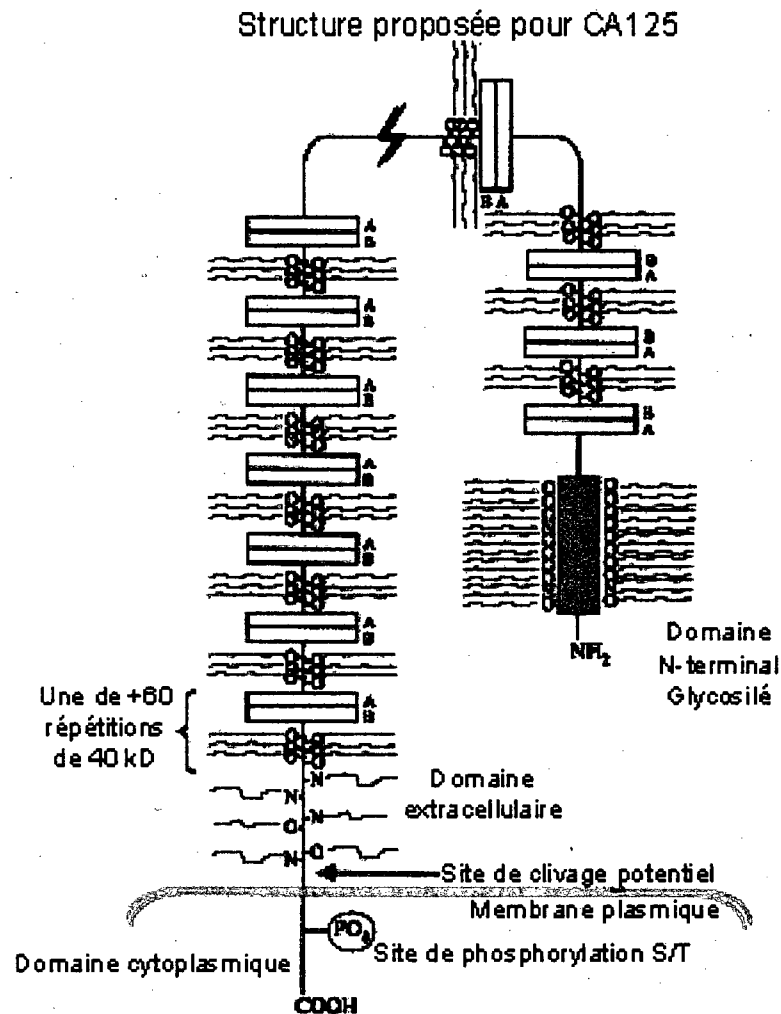


Figure 10 : Structure de CA125 proposée par le groupe O'Brien en 2001

Structure proposée par le groupe de O'Brien en 2001 suite au clonage du cADN de la protéine. Elle comprend un domaine N-terminal fortement glycosylé en O et en N, un domaine de répétitions en tandem dont les répétitions pourraient être répétées plus de 60 fois et qui comprend également de nombreuses glycosylations en O et en N, et un domaine C-terminal qui comprend un domaine unique avec un site de clivage potentiel juxtamembranaire et quelques glycosylations en O et en N, une courte section transmembranaire et une courte queue cytoplasmique avec quelques sites potentiels de phosphorylation. (Modifiée de O'BRIEN *et al.*, 2001).

4.2. Les interactions de CA125 avec d'autres protéines

Bien que très peu de choses soient connues sur CA125, quelques groupes de chercheurs ont été en mesure de démontrer une interaction avec certaines protéines. Ainsi, il a été démontré que la protéine était en mesure de se lier à la galectine-1 (SEELENMEYER *et al.*, 2003). Les galectines sont des protéines de la famille des lectines qui sont à la fois intracellulaires et sécrétées au niveau extracellulaire. Dans le milieu extracellulaire, elles interagissent avec des glycoprotéines situées à la surface des cellules et au niveau de la matrice extracellulaire (LE MERCIER *et al.*, 2009). Dans le milieu intracellulaire, elles interagissent avec des protéines cytoplasmiques ou nucléaires (LE MERCIER *et al.*, 2009). Les galectines sont impliquées dans de nombreux processus tels que l'adhésion cellulaire, la prolifération, l'apoptose, le développement embryonnaire et peuvent également influencer la progression tumorale (SEELENMEYER *et al.*, 2003; LE MERCIER *et al.*, 2009). Ainsi, cette association pourrait avoir un rôle à jouer au niveau du développement et de la progression du cancer de l'ovaire. Nos collaborateurs ont également démontré que CA125 lie la mésothéline (GUBBELS *et al.*, 2006). Cette liaison serait dépendante des glycosylations associées à CA125. De plus, la liaison de ces deux protéines pourrait influencer l'adhésion cellulaire et favoriser les métastases associées au cancer de l'ovaire (GUBBELS *et al.*, 2006; RUMP *et al.*, 2004). En effet, les cellules mésothéliales qui tapissent le péritoine expriment la mésothéline. Certaines expériences effectuées dans notre laboratoire semblent aussi indiquer une interaction de CA125 avec la E-cadhérine, la sous unité C de l'ATP synthase au niveau des mitochondries ainsi qu'une interaction avec une protéine de pore nucléaire (données non publiées).

4.3. Les fonctions associées à CA125

Certaines fonctions ont été associées à CA125 bien que la fonction véritable de la protéine demeure incertaine. Ainsi, en se fiant au patron d'expression de la protéine dans les tissus normaux, CA125 pourrait servir de lubrifiant et prévenir l'adhésion cellulaire (GAETJE *et al.*, 2002; DORIGO et BEREK, 2007). La fonction de lubrifiant est d'ailleurs associée à d'autres mucines. CA125 semble également favoriser l'évasion du système immunitaire. Cette fonction pourrait être l'une des raisons de l'expression de CA125 par certains tissus et au niveau de certains liquides biologiques dont le liquide amniotique, le sang et le lait des femmes enceintes (BARBATI *et al.*, 1996). Ainsi, des glycans attachés à la portion extracellulaire de CA125 ont été associés à des fonctions immunomodulatoires (WONG *et al.*, 2003). De plus, nos collaborateurs ont démontré que CA125 est en mesure d'inhiber l'activité cytotoxique des cellules immunitaires *natural killer* (cellules NK) qui sont des cellules souvent impliquées dans la réponse antitumorale de l'organisme (PATANKAR *et al.*, 2005; BELISLE *et al.*, 2007). CA125 pourrait également avoir un autre effet sur les cellules NK. En effet, des cellules NK dont l'activité cytotoxique a été inhibée, possiblement à travers leur interaction avec CA125, sont communément retrouvées chez les patientes atteintes de cancers épithéliaux de l'ovaire et chez les femmes enceintes (BELISLE *et al.*, 2007; HANNA *et al.*, 2006). Les cellules NK retrouvées chez les femmes enceintes sécrèteraient des facteurs pro-angiogéniques et stimuleraient la migration et l'invasion de trophoblastes (HANNA *et al.*, 2006). Il est donc possible que l'interaction de cellules NK et de CA125 entraîne la sécrétion de facteurs angiogéniques et migratoires qui encourageraient le développement tumoral et favoriseraient la formation de métastases et la

progression des cancers épithéliaux de l'ovaire (BELISLE *et al.*, 2007). Une autre mucine, MUC18, serait également en mesure de stimuler l'angiogénèse de tumeurs cancéreuses (SERS *et al.*, 1994). Récemment, des souris perte de fonction pour CA125 (knockout) suggèrent que, comme c'est le cas des mucines transmembranaires MUC1 et MUC4, l'expression de CA125 n'est pas nécessaire pour le développement ou pour la reproduction normales des souris (CHEON *et al.*, 2009). De nombreuses recherches sont encore nécessaires afin d'établir avec certitude quelles sont les fonctions de CA125.

5. Modèles d'études utilisés et résultats obtenus par le laboratoire

Dans le laboratoire, il y a principalement deux modèles d'étude qui ont été mis au point afin d'étudier les fonctions et les interactions de CA125. Ces modèles ont permis d'obtenir de nombreux résultats qui ont servi de base préliminaire au projet décrit par ce mémoire.

5.1. Le modèle perte de fonction

Le premier modèle du laboratoire est un modèle dit perte de fonction. Dans ce modèle, une lignée cancéreuse de l'ovaire qui exprime fortement CA125, soit les NIH :OVCAR-3, a été transfectée de façon stable avec un 'single-chain fragment variable' ou mini anticorps (scFv) dirigé contre CA125. Les scFv utilisés par le laboratoire sont dotés d'un signal de localisation et de rétention au réticulum endoplasmique. La protéine contre laquelle ils sont dirigés, soit CA125 dans ce cas, se voit alors séquestrée au réticulum endoplasmique et vraisemblablement dégradée par le protéasome. Cette séquestration empêche ainsi la

localisation membranaire habituelle de CA125 et simule du même coup un ‘knockdown’ de la protéine. L’inhibition de CA125 observée dans le modèle perte de fonction n’est pas parfaite. En effet, les deux clones stables qui contiennent des scFv dirigés contre CA125 expriment encore une faible concentration membranaire de CA125. Cependant, l’inhibition de la localisation habituelle de CA125 est suffisante pour que de nombreuses différences phénotypiques aient été observées.

Le modèle perte de fonction compte quatre populations et clones de cellules : la lignée parentale OVCAR-3, le clone stable 4 :5 # 12 (un contrôle négatif qui exprime un scFv qui ne lie pas CA125), le clone stable 1 :9 # 9 et le clone stable 1 :9 # 7 (deux lignées où CA125 se retrouve partiellement séquestré au réticulum endoplasmique par un scFv). La description détaillée de ce modèle se retrouve dans le mémoire de Julie Beaudin (BEAUDIN, 2003).

5.2. Le modèle gain de fonction

Le deuxième modèle utilisé par le laboratoire est un modèle dit gain de fonction. Ce modèle a été fait à partir de la lignée cellulaire SKOV-3, une lignée cancéreuse de l’ovaire qui n’exprime pas CA125. Un vecteur plasmidique a été utilisé pour établir une population stable de cellules SKOV-3 qui exprime la portion C-terminal de CA125 (CTD). Vu la grande taille de la protéine, il était impossible de cloner et de transfecter la protéine CA125 en entier dans une lignée cellulaire. Le choix de la portion CTD de CA125 vient en partie de l’importance de la queue cytoplasmique d’une autre mucine : MUC1. La portion CTD

de CA125 qui est exprimée par ces cellules comprend le domaine unique, le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique de la protéine. Des étiquettes His₍₆₎ et C-Myc ont été ajoutées à l'extrémité C-terminal de la construction. En effet, les anticorps actuellement utilisés pour la détection de CA125 sont dirigés contre des épitopes présents dans le domaine des répétitions en tandem de la protéine. Trois populations de cellules sont utilisées avec ce modèle : la population parentale SKOV-3, la population contrôle qui exprime un vecteur vide (SKOV-3 EV) et la population qui exprime le domaine CTD de la protéine (SKOV-3 CTD). La description détaillée de ce modèle se retrouve dans le mémoire de Marianne Boivin (BOIVIN, 2005).

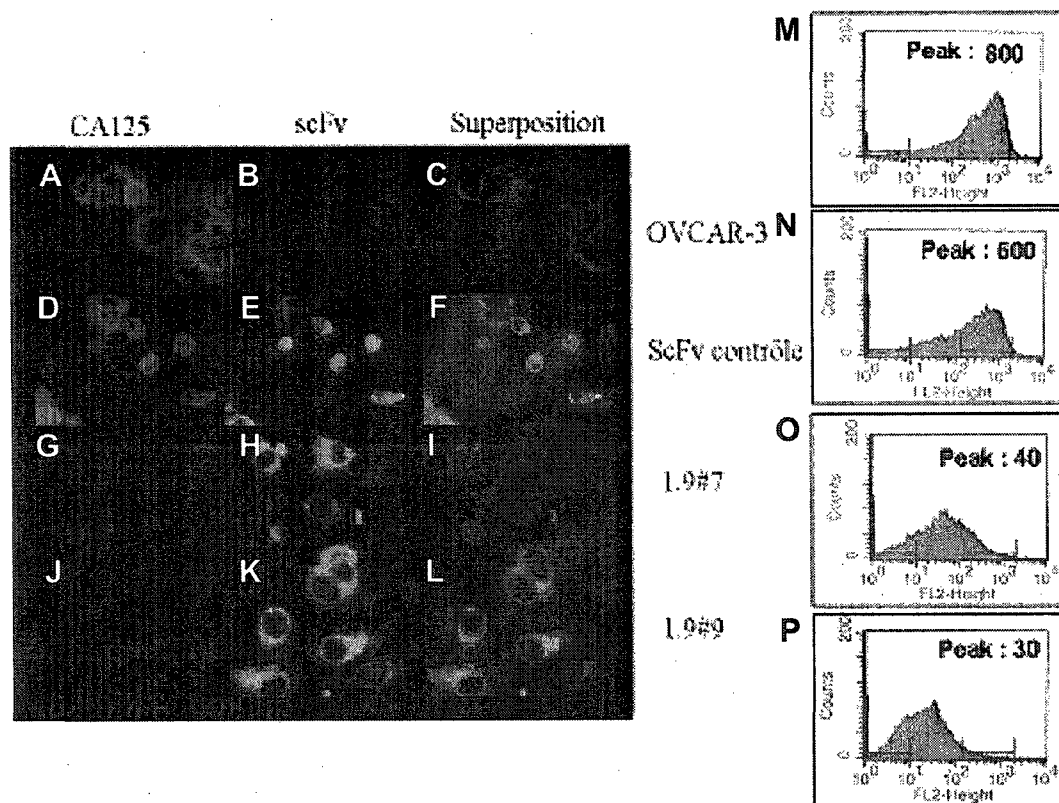


Figure 11 : Validation des clones knockdowns de CA125

A-L : Expérience d'immunofluorescence effectuée sur les différents clones OVCAR-3. A, D, G et J : expression de CA125 chez les cellules contrôles (A et D) et chez les cellules 'knockdowns' (G et J). B, E, H et K : expression des scFv chez les cellules 'knockdown' (H et K), chez les cellules scFv contrôles 4:5 #12 (E) et absence d'expression de scFv chez la lignée parentale OVCAR-3 (B). C, F, I et L : superposition de l'expression de CA125 et de l'expression des scFv. M, N, O et P : niveau d'expression de CA125 évalué par cytométrie de flux chez les cellules contrôles (M et N) et chez les clones 'knockdown' (O et P) (Modifiée du mémoire BEAUDIN, 2003).

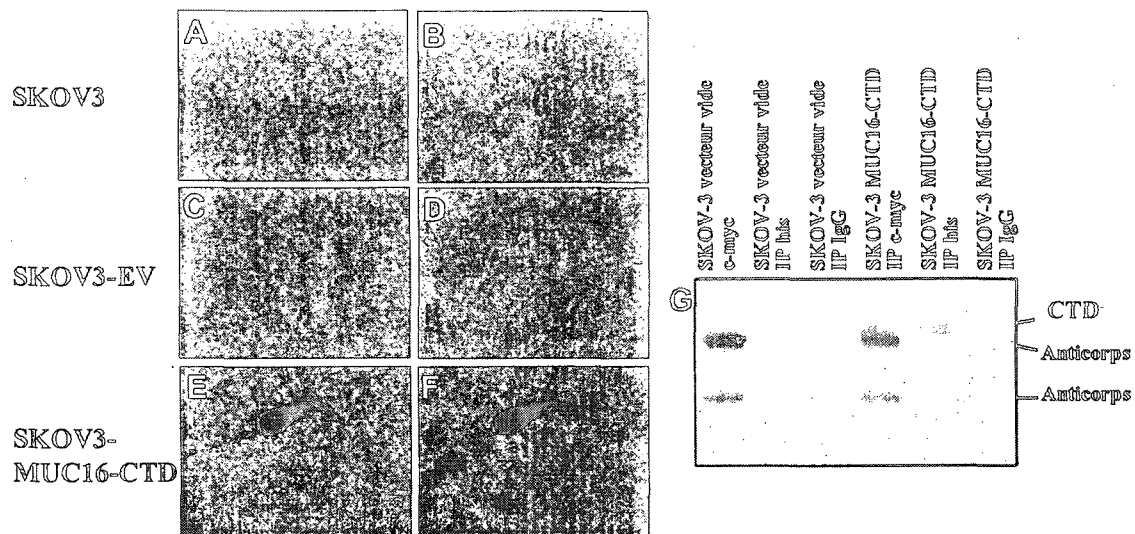


Figure 12 : Validation des populations SKOV-3

A-F : Immunofluorescence pour vérifier l'expression de la construction CTD chez les cellules SKOV-3. A, C et E : détection de l'étiquette C-Myc de la construction CTD chez les populations contrôles (A et C) et chez la population transfectée avec la construction CTD (E). B, D et F : marquage des noyaux cellulaires au DAPI superposé avec les images de la détection de l'étiquette C-Myc de la construction CTD. G : Immunoprécipitation de la construction CTD chez les différentes populations SKOV-3 (Modifiée du mémoire BOIVIN, 2005).

5.3. Résultats obtenus jusqu'à présent par le laboratoire

Les expériences effectuées avec les modèles d'études présentés lors des sections précédentes ont permis au laboratoire d'associer certaines caractéristiques à l'expression de CA125 ou à l'expression exclusive de son CTD. Ces caractéristiques sont résumées dans le tableau 2.

Phénotype observé	Modèle perte de fonction (knockdown)	Modèle gain de fonction (CTD)
Temps de doublement	Aucun effet	?
Sensibilité à l'inhibition de contact	↑	?
Croissance en absence d'ancrage (milieu semi-solide)	↓	?
Formation de foyers post-confluence	↓	?
Formation de sphéroïdes	↓↓	?
Formation de tumeurs chez souris NUDE et SCID	Non	?
Morphologie cellulaire	Épithéliale ↓ Mésenchymateuse	Mésenchymateuse ↓ Mésenchymateuse
Sensibilité au cisplatine	↑	↓
Jonctions cellulaires	↓	?
Migration	↑	?

Tableau 2 : Caractéristiques associées au gain ou à la perte de CA125

Caractéristiques associées aux clones 'knockdown' de CA125 chez les cellules OVCAR-3 et aux populations gain de fonction chez les cellules SKOV-3. (Modifié de MIGNEAULT, 2007)

Bien que quelques expériences ont déjà été effectuées sur le modèle gain de fonction (BOIVIN, 2005), la comparaison avec le modèle perte de fonction reste encore à compléter. Cependant, les résultats obtenus avec le modèle perte de fonction nous ont permis d'associer quelques fonctions à CA125. Selon les résultats obtenus, CA125 ne semble pas

affecter la vitesse de croissance des cellules. Cependant, la présence de CA125 semble augmenter la tumorigénicité des cellules chez les cellules OVCAR-3. L'effet de CA125 sur la tumorigénicité des cellules pourrait emprunter plusieurs voies (revoir la figure 1). En effet, la présence de CA125 pourrait jouer au niveau de la dépendance des cellules aux facteurs de croissance et aux facteurs inhibiteurs de croissance (diminution de l'inhibition de contact, augmentation de la croissance en présence d'ancrage limité, formation de foyers post confluence et augmentation de la formation de sphéroïdes). La présence de CA125 semble aussi influencer les interactions cellules-cellules (augmentation des jonctions cellulaires, diminution de l'inhibition de contact, augmentation de la formation de sphéroïdes). L'effet sur les interactions cellulaires pourrait encourager l'indépendance des cellules face aux facteurs de croissances et aux facteurs inhibiteurs de croissance. Certains effets sur la résistance aux agents chimiothérapeutiques ont également été observés. Ainsi, des résultats obtenus par le laboratoire indiquent que CA125 ou sa queue cytoplasmique augmente la résistance des cellules au cisplatine, un agent de chimiothérapie utilisé dans le traitement du cancer de l'ovaire qui cible l'ADN des cellules cancéreuses. Cette résistance pourrait indiquer un effet de CA125 ou de sa queue cytoplasmique sur la résistance à l'apoptose.

Globalement, les résultats obtenus par notre laboratoire indiquent que CA125 pourrait encourager le développement et la progression du cancer de l'ovaire. Les domaines de la protéine responsables de l'octroi de ses fonctions demeurent cependant inconnus. Ainsi, les résultats obtenus en culture cellulaire et ceux obtenus à partir d'expériences faites sur les souris semblent attribuer un caractère oncogénique à la queue cytoplasmique de CA125.

5.4. Hypothèse et but du projet

Les fonctions de CA125 et le rôle que cette protéine pourrait jouer au niveau du cancer de l'ovaire demeurent nébuleux. Le fait que les cellules épithéliales de l'ovaire n'expriment pas CA125 contrairement à leurs équivalentes cancéreuses peut indiquer que la protéine a un rôle important à jouer au niveau du développement du cancer de l'ovaire ou de sa progression. Les différents résultats obtenus par le laboratoire semblent également confirmer cette hypothèse. Les effets de la protéine sur différents phénotypes au niveau de cultures cellulaires ainsi que les effets de la protéine sur la tumorigénicité des cellules chez les souris semblent attribuer des caractéristiques oncogéniques à la protéine.

L'hypothèse sur laquelle est basée ce mémoire est que CA125 est un oncogène. Le premier objectif de ce mémoire était de vérifier si le CTD de CA125 suffi pour augmenter la tumorigénicité de cellules cancéreuses de l'ovaire CA125 négative. Les expériences effectuées lors de ce premier objectif permettront de compléter le tableau 2 des caractéristiques associées au gain ou à la perte de CA125 présenté à la page 43. Le deuxième objectif de ce projet était de vérifier si le CTD de CA125 peut être qualifiée d'oncogène par des expériences de transformation sur des cellules non-transformées immortalisées ou non. Le dernier objectif de ce projet était de vérifier les effets du CTD de CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité chez des OSE immortalisées par l'expression de la télomérase. Le modèle gain de fonction (BOIVIN, 2005) a été utilisé pour atteindre le premier objectif de ce mémoire. Afin d'atteindre les objectifs deux et trois, un vecteur lentiviral qui permet l'expression de la queue

cytoplasmique de CA125 a été construit. Le système d'expression lentiviral a été choisi pour sa haute efficacité d'infection comparativement aux autres systèmes d'expression virale et aux autres systèmes d'expression par transfection de plasmides utilisés jusqu'à présent par le laboratoire. Les lentivirus CTD créés ont été utilisés pour la formation de populations stables dans différentes lignées cellulaires.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

6. Lignées cellulaires utilisées et culture cellulaire

Les différentes lignées cellulaires utilisées lors de ce projet sont décrites dans le tableau 3. Les milieux de culture utilisés pour chacune des lignées sont décrits dans le tableau 4. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans des T-75 (BD Falcon) et incubées dans des incubateurs Steri-Cycle CO₂ HEPA FILTER (Thermo Forma) à 37°C avec 5% de CO₂. Les passages cellulaires ont été effectués une (OVN 225T, OVN321T, OVN 211T hTERT) à deux fois par semaine (OVN 221T, OVN 95T hTERT, NIH 3T3, 293T, HFL-1, SKOV-3) lorsque les cellules atteignaient une confluence de 90% à 95%.

Lors des passages cellulaires, le surnageant des cultures a été aspiré et les cellules ont été lavées avec 5 mL de PBS (WISSENT Inc.). Le lavage au PBS a été omis chez les cellules 293T vu leur faible adhérence à la paroi de leur T-75. Les cellules ont ensuite été décollées à l'aide d'une incubation 1 à 5 minutes dans les incubateurs de culture avec 2 mL d'une solution 0,05% trypsine et 0,53 mM EDTA (WISSENT Inc.). Les T-75 qui contenaient les cellules maintenant en suspension ont été rincés avec 4 mL de milieux de culture et la solution a été recueillie dans des tubes de 15 mL. Les solutions cellulaires ont été centrifugées à 167 g pendant 5 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Labofuge 400R (VWR Canlab). Le surnageant des cellules a été jeté, les culots de cellules ont été suspendues dans du

milieu de culture et 1/3 des cellules (les lignées OVN, les NIH 3T3 et les HFL-1) ou 1/8 (les 293T) des cellules ont été réensemencées dans leur T-75 respectif. Du milieu de culture a été ajouté aux T-75 de façon à obtenir un volume total de 10 mL.

Lignées cellulaires	Description de la lignée	Provenance
SKOV-3	Lignée cancéreuse de l'ovaire CA 125 négatives	American Type Culture Collection
SKOV-3 EV	Population stable SKOV-3 transfectée avec un vecteur vide	Cellules établies et congelées (BOIVIN, 2005)
SKOV-3 CTD	Population stable SKOV-3 qui exprime la portion CTD de CA 125	Cellules établies et congelées (BOIVIN, 2005)
OVN 221T	Lignées cellulaires OSE isolées à partir d'un explant d'ovaire normal provenant d'une patiente	Banque de tissu de l'ovaire du FRSQ (Sherbrooke, Québec)
OVN 225T		
OVN 321T		
OVN 211T hTERT	Lignées cellulaires OSE isolées à partir d'un explant d'ovaire normal provenant d'une patiente qui ont été immortalisées à l'aide d'un adénovirus qui entraîne l'expression de la télomérase	Banque de tissus de l'ovaire FRSQ (Sherbrooke, Québec)
OVN 95T hTERT		
NIH 3T3	Fibroblastes embryonnaires de souris spontanément immortalisés	American Type Culture Collection
293T	Cellules qui proviennent de la lignée 293 de cellules primaires embryonnaires de rein qui a été transformée avec de l'ADN de l'adénovirus humain type 5. Les 293T ont également été infectées avec le SV40 large T antigen.	Obtenues du laboratoire du Dr. François Boudreau de l'Université de Sherbrooke (Sherbrooke, Québec)
HFL-1	Fibroblastes humains de poumons non-transformés et non-immortalisés	American Type Culture Collection

Tableau 3 : Informations sur les lignées cellulaires utilisées

Lignées cellulaires	Milieux de culture (WISENT Inc.)	Ajouts spécifiques	Complétion des milieux (WISENT Inc.)
SKOV-3	DMEM/F12 50/50 mix	_____	10% FBS 2,5 µg/mL amphotericin B 2 mM L-glutamine 100 µg/mL streptomycin 100 IU/mL penicillin
SKOV-3 EV		100 mg/mL Zéocine™ (Invitrogen)	
SKOV-3 CTD			
OVN 221T	OSE	0,1 µM β-Estradiol (SIGMA)	
OVN 225T			
OVN 321T			
OVN 211T hTERT			
OVN 95T hTERT	OSE	0,1 µM β-Estradiol 50 µg/mL Hygromycin B (Roche)	
NIH 3T3	DMEM	_____	
293T	DMEM	0.1 mM MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Invitrogen) 10 mM Hépès (WISENT Inc.)	
HFL-1	DMEM/F12 50/50 mix	_____	

Tableau 4 : Milieux de culture utilisés pour chaque lignée cellulaire

CGC GGA TCC ATT ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG-3' (CTD (init.)) et 5'-T GAT ATC TCA ATT CAG ATC CTC TTC TGA GAT GA-3' (CTD (Fin)) ont été utilisées lors d'un PCR effectué sur le plasmide pSTCF CTD. Brièvement, une solution de 20 ng de plasmide pSTCF CTD, 1 mM de l'amorce CTD (init.) (IDT Inc.), 1 mM de l'amorce CTD (fin) (IDT Inc.), 5 µL de tampon Pfu 10X (préparé par Catherine Desrosiers, Département de microbiologie et d'infectiologie, Université de Sherbrooke), 0,5 mM de dNTP (GE Healthcare) dans 49,5 µL d'eau Baxter a été préparée. Dans un appareil PCR Eppendorf Mastercycler gradient (Brinkmann) les échantillons ont été chauffés à 94°C pendant 4 minutes. 1,25 U d'enzyme Pfu DNA polymérase (préparée par Catherine Desrosiers, Département de microbiologie et d'infectiologie, Université de Sherbrooke) a été ajouté à chaque réaction de PCR. À 30 reprises, les échantillons ont été dénaturés à 94°C pour 1 minute, hybridés à 59°C pour 2 minutes et polymérisés à 72°C pendant 2 minutes. Suite aux 30 répétitions, les échantillons ont été incubés à 72°C pour 15 minutes et ensuite préservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Un gel d'agarose LE 0,7% (Roche) dans du TAE (40 mM Tris (Roche), 1 mM EDTA pH8 (SIGMA), 20 mM Acide Acétique Glaciale (Fisher Scientific)) a été préparé avec du bromure d'éthidium 1 : 10 000 (Pharmacia Biotech) afin de vérifier le bon fonctionnement de la réaction de PCR. 0,5 µL des réactions de PCR a été placé sur le gel d'agarose et le tout a été migré 45 minutes à 120V. Les produits de PCR ont été observés à la lumière ultraviolette à l'aide d'un appareil Bio/Can True View 300.

7.2. Construction du vecteur pLenti/Adapteur CTD

Cinq cents nanogramme de vecteur pLenti6V5/adapteur et 10 μ L de la réaction de PCR de l'insert CTD ont été digérés par EcoRV (New England BioLabs inc.) et ensuite par BamHI (New England BioLabs inc.). Les digestions enzymatiques ont été faites dans 20 μ L d'eau Baxter avec 100 μ g/mL de BSA (New England BioLabs inc.) et du tampon BamHI (New England BioLabs inc.) selon les recommandations de la compagnie. Les solutions ont d'abord été placées à 37°C en présence de 10 U de BamHI pendant 2 heures. 10 U de EcoRV ont ensuite été ajoutées et les solutions ont été incubées à 37°C pour 2 heures additionnelles. Les produits de digestion ont été purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction Kit (50) (QIAGEN) selon les instructions fournies par la compagnie.

Deux microlitres des digestions purifiées sur gel ont été placés sur gel d'agarose afin de déterminer approximativement le rapport molaire insert : vecteur. Les solutions de ligation ont été préparées en mélangeant 1,5 μ L de tampon 10X de la T4 DNA ligase (Catherine Desrosiers, Département de Microbiologie et d'infectiologie, Université de Sherbrooke), 0,5 μ L de T4 DNA ligase (Catherine Desrosiers, Département de Microbiologie et d'infectiologie, Université de Sherbrooke), 1 μ L de vecteur digéré et purifié, un volume d'insert CTD digéré et purifié qui correspond à un ratio molaire de 1 :100 (vecteur : insert) et de l'eau Baxter pour obtenir un volume total de 15 μ L. Les réactions de ligation ont été incubées à température ambiante pour la nuit.

7.3. Transformation de bactéries STBL-3 compétentes

Des bactéries STBL-3 électrocompétentes (Invitrogen), gracieusement offertes par le laboratoire du Dr. François Boudreau (Département de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke), ont été rendues compétentes par choc thermique selon le protocole décrit par le livre Molecular cloning : A laboratory Manual et entreposées à -80°C dans des aliquots de 200 µL jusqu'à leur utilisation (SAMBROOK et RUSSELL, Vol.1 p1.116-1.118, protocole 25). Lors de la transformation, des STBL-3 compétentes ont été décongelées sur glace et 100 µL de STBL-3 compétentes ont été ajoutées à chacune des réactions de ligation. Les solutions ont été incubées sur glace 10 minutes. Les bactéries ont ensuite subies un choc thermique lors d'une incubation de 45 secondes à 42°C. Les échantillons ont ensuite été replacés sur glace pendant 2 minutes. 900 µL de LB Broth stérile (0.17 M chlorure de sodium (Fisher Scientific), 1% (m/v) Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and company), 0,5% (m/v) Yeast Extract granulated (EMD Chemicals Inc.)) a été ajouté à chaque échantillon et le tout a été incubé à 37°C pendant 1 heure. À température ambiante, les solutions bactériennes ont été centrifugées à 2500 g pour 5 minutes dans une Biofuge pico (Heraeus). Les bactéries ont été suspendues dans 200 µL de milieu LB Broth stérile et des Pétri de LB Agar avec de l'ampicilline (0.17 M chlorure de sodium, 1% (m/v) Bacto™ Tryptone (Becton, Dickinson and company), 0,5% (m/v) Yeast Extract granulated (EMD Chemicals Inc.), 1,5% (m/v) Agar-agar Granulated (EMD Chemicals Inc.), 0,27 mM d'Ampicillin Sodium Salt Ultrapure (USB corporation, Cleveland, Ohio))

ont été inoculés avec 100 µL de la solution bactérienne résultante. Les Pétris ont été incubés pour la nuit en position inversée à 37°C.

7.4. Analyse des vecteurs pLenti/Adapteur CTD positifs

Les colonies obtenues ont été prélevées pour inoculer des éprouvettes de 5 mL de LB Broth stérile / 0,27 mM d'ampicillin. Le prélèvement de petites colonies a été favorisé afin d'éviter les colonies transformées avec des plasmides mutants. Les cultures des clones STBL-3 pLenti CTD ont été incubées avec agitation à 37°C pour la nuit. Des minipreps ont ensuite été effectuées avec le kit QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) (QIAGEN) selon les instructions fournies. L'ADN obtenu a été analysé en faisant migrer 1 µL de chaque miniprep sur un gel 0,7 % agarose / TAE. La présence de l'insert chez les vecteurs d'apparence positive a été vérifiée en utilisant la réaction PCR décrite à la section 7.1 de ce mémoire. Le reste des cultures des clones positifs a été divisé en aliquotes de 1 mL et congelés à -80°C avec 10% (v/v) de glycérol stérile (Roche). Les vecteurs pLenti CTD positifs ont ensuite été envoyés séquencés à la compagnie Bio S&T (Lachine, Québec) afin de s'assurer de l'absence de mutations dans la séquence clonée. Les vecteurs positifs ont été amplifiés en combinant l'ADN recueillis par 3 minipreps supplémentaires. La construction pLenti CTD résultante est illustrée à la figure 14.

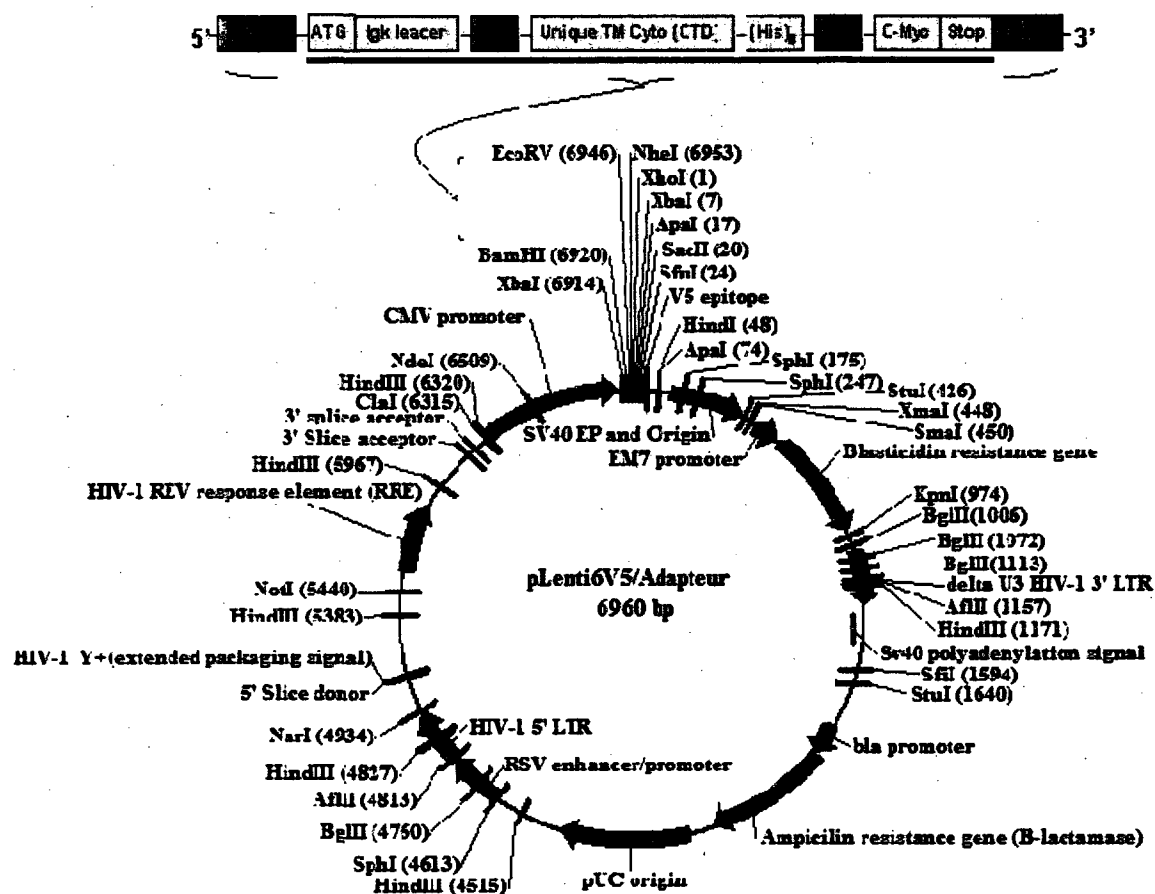


Figure 14 : Construction pLenti CTD

La construction CTD insérée dans le plasmide pLenti6V5/Adapteur entre les sites de restrictions BamHI et EcoRV. Les sites de restrictions présents dans la construction sont illustrés en bleu foncé. Les régions fonctionnellement importantes à la protéine sont illustrées en bleu pâle. La partie de la construction qui est traduite est soulignée en rouge.

7.5. Production des lentivirus

Des cellules 293T (<p15) ont été décongelées et cultivées pour au moins 1 passage cellulaire. Les cellules ont ensuite été transfectées avec les plasmides codant pour les différentes composantes virales pLP1, pLP2 et pLP/VSVG ((Invitrogen) obtenus du laboratoire du Dr. François Boudreau, Département de biologie cellulaire,

Université de Sherbrooke) et avec la construction pLenti CTD2, la construction pLenti Cyto6 ou la construction pLenti GFP (obtenue du laboratoire du Dr. François Boudreau, Département de biologie cellulaire, Université de Sherbrooke) (voir figure 15).

Pour la transfection, 5 000 000 de cellules ont étéensemencées dans des T-75. Les cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ pour la nuit afin de permettre aux cellules d'adhérer. Le lendemain, les solutions qui suivent ont été préparées pour chacune des transfections. 6 µg des plasmides pLP1, pLP2, pLP/VSVG (Invitrogen) et 6 µg de l'une des trois constructions pLenti illustrées à la figure 15, ont été ajoutés à 1,5 mL de milieu OPTI-MEM[®]I (GIBCO Invitrogen). Parallèlement, des solutions de 48 µL de Lipofectamine[™] 2000 Reagent (Invitrogen) dans 1,5 mL de milieu OPTI-MEM[®]I ont été préparées. Les solutions de lipofectamine ont été incubées 5 minutes à température ambiante. Les solutions de plasmides ont été combinées aux solutions de lipofectamine et les mélanges résultants ont été incubés à température pièce pendant 20 minutes. Pendant cette incubation, les cellules 293T à transfecter ont été rincées doucement avec 5 mL de milieu de culture DMEM sans antibiotique. 5 mL de OPTI-MEM a doucement été ajouté aux cellules. Une fois l'incubation des mélanges de plasmides et de lipofectamine terminée, ceux-ci ont doucement été ajoutés aux cellules 293T. Les transfections ont ensuite été incubées 4 heures à 37°C et 5% de CO₂. Après les 4 heures d'incubation, la solution de transfection a été retirée et remplacée par 10 mL

de milieu de culture DMEM complet. Les cellules ont ensuite été mises en incubation 48 heures à 37°C et 5 % de CO₂.

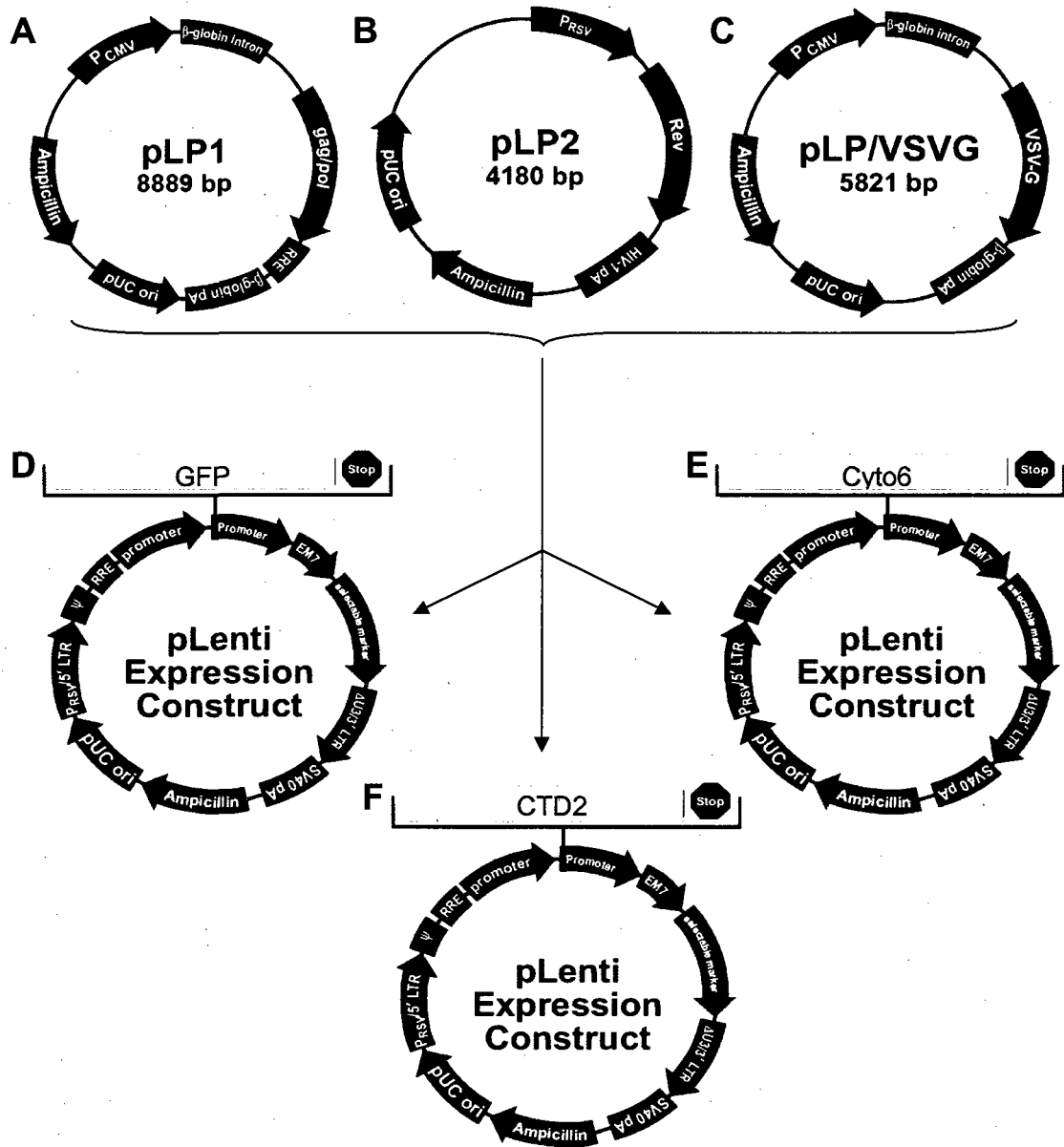


Figure 15 : Les plasmides utilisés pour la production de lentivirus

A, B et C : Les plasmides pLP1, pLP2 et pLP/VSVG qui codent pour les différentes composantes des lentivirus. D, E et F : Les différentes constructions pLenti6V5 qui servent de contrôles (D et E) ou qui exprime le CTD de CA 125 (F).

Quarante-huit heures plus tard, les virus produits ont été prélevés et filtrés sur un Acrodisc® 25 mm Syringe Filter W/ 0,45 µm Supor® Membrane (PALL Corporation). La solution virale a été répartie en aliquotes de 700 µL et entreposée à -80°C jusqu'à son utilisation.

8. Infection des lignées cellulaires et établissement de populations stables

Les différentes lignées cellulaires à infecter ont étéensemencées dans des plaques 6 puits de façon à ce que les cellules atteignent une confluence de 50% le lendemain. Le jour de l'infection, des aliquots de virus ont été rapidement décongelés dans un bain chauffant à 37°C et 4 µg/mL d'hexadiméthrine bromide (polybrène) (SIGMA-ALDRICH®) a été ajouté aux solutions virales. Le surnageant des cellules a été retiré et 700 µL (1 aliquote) de solution virale avec polybrène a été ajouté à chaque puit. Les plaques 6 puits ont été incubées 1 heure à 37°C et 5% de CO₂. Ensuite, 2 mL de milieu complet avec 4 µg/mL de polybrène ont été rajoutés à chaque puit. Les cellules ont ensuite été laissées 2 jours à 37°C et 5% de CO₂.

Suite aux 2 jours d'incubation, la sélection des cellules a été amorcée avec du milieu de culture complet avec les concentrations de blasticidine S HCl (Invitrogen) indiquées dans le tableau 5. La sélection des populations formées à partir de lignées cellulaires non immortalisées (les HFL-1, les OVN 321T, les OVN 225T et les OVN 221T) a été effectuée suite à l'atteinte d'une confluence de 50%. En effet, les

lentivirus semblaient induire une forte mortalité chez ces lignées 3 à 4 jours après leur infection. Un taux similaire de mortalité associée à l'infection virale a été observé chez les cellules OVN 211T hTERT malgré l'immortalisation de celles-ci. L'efficacité des infections a été déduite à partir des cellules infectées avec le virus pLenti GFP. Un microscope à fluorescence Olympus1X70 (Olympus) a alors été utilisé pour observer l'expression de la GFP chez les cellules contrôles GFP.

La sélection des cellules correctement infectées avec les différents virus pLenti était considérée complète après 10 jours en présence de milieu complet avec une concentration adéquate de blasticidine et suite à la mort des cellules contrôles non infectées. En accord avec les règles de sécurité associées à l'utilisation des lentivirus, aucune expérience n'a été effectuée sur les cellules avant que celles-ci n'aient été passées à trois reprises ou que trois semaines ne se soit écoulées depuis leur infection.

Lignées cellulaires	Concentrations de blasticidine
NIH 3T3	0,5 µg/mL
HFL-1	1,5 µg/mL
OVN 321T	1 µg/mL
OVN 225T	0,5 µg/mL
OVN 221T	1 µg/mL
OVN 95T hTERT	1 µg/mL
OVN 211T hTERT	1 µg/mL

Tableau 5 : Concentration de blasticidine pour la sélection des différentes lignées

9. Validation des populations cellulaires

9.1. Extraction d'ARN et RT PCR

Suite à leur sélection et après un temps adéquat selon les règles de sécurité, l'ARN des différentes populations a été extrait. Les manipulations effectuées lors de l'extraction d'ARN ont été faites avec des matériaux et des réactifs sans RNase. Ainsi, un T-75 à 95% de confluence a été lavé avec 5 mL de PBS. Le PBS a été enlevé et, sous une hotte chimique, 900 µL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) a été ajouté. Ensuite, les contenants ont été doucement agités afin de répartir le TRIzol sur les cellules. À l'aide de grattoirs 25 cm (SARSTEDT), les cellules ont été décollées de la paroi des T-75. La solution de TRIzol et d'ARN a été récupérée et transférée dans des tubes de 1,5 mL. La solution d'ARN a été agitée puis incubée à température ambiante pour 5 minutes. Toujours sous la hotte chimique, 200 µL de Chloroforme A.C.S. Réactif (FisherScientific) a été ajouté à chaque échantillon. Les échantillons ont été agités quelques secondes et incubés 10 minutes à température ambiante. Après l'incubation, les échantillons ont été centrifugés à une vitesse de 16 060 g à 4°C pendant 15 minutes. La phase supérieure des échantillons a été récupérée et transférée dans de nouveaux tubes de 1,5 mL. Cinq cents microlitre de chloroforme a été ajouté aux échantillons et ceux-ci ont été agités quelques secondes. Les échantillons ont immédiatement été centrifugés quelques secondes et la phase du dessus a été transférée dans un nouveau tube de 1,5 mL. Un volume d'isopropanol équivalant au volume de solution d'ARN déjà contenue par

les tubes a été ajouté. Les échantillons ont été agités quelques secondes et incubés 5 minutes à température ambiante. Les tubes ont été centrifugés à une vitesse 16 060 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant des tubes a été retiré et 900 µL d'éthanol 75% a été ajouté. Les tubes ont été centrifugés à une vitesse de 16 060 g à 4°C pendant 5 minutes. Le surnageant des échantillons a été retiré et les culots d'ARN ont été séchés à l'air ambiant. Une fois les culots séchés, 25 µL d'eau DEPC a été ajoutée aux tubes et le tout a été incubé à température ambiante pour 1 heure. L'eau DEPC a été préalablement préparée avec du Diethyl Pyrocarbonate (SIGMA CHEMICAL COMPANY) en suivant les instructions de la page 7.84 de Sambrook et Russel, 2001. Les échantillons ont ensuite été légèrement agités afin de resuspendre les culots d'ARN avant d'être entreposés à -80°C. Les échantillons ont été dosés avec un DU Series 600 Spectrophotometer (Beckman Instrument). L'intégrité des échantillons a également été vérifiée en faisant migrer 1 µL de l'ARN isolé sur un gel 0,7% d'agarose / TAE RNase free.

Un RT PCR a été effectué sur les différents échantillons afin de valider l'expression du mARN de la construction CTD. Ainsi, dans des tubes de 0,2 mL, 2 µg d'ARN de chaque échantillon a été mélangé avec 1 µg d'Oligo(dT) 15 primer (Promega). Le volume total de la solution obtenue a ensuite été porté à 15 µL avec de l'eau DEPC. Les tubes ont été incubés à 70°C pendant 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été incubés sur glace pendant 5 minutes. Après l'incubation sur glace, 2 µL de dNTP 25mM, 5 µL de MMuLV RT 5X reaction buffer (Catherine Desrosiers, Département de microbiologie et d'infectiologie, Université de Sherbrooke),

environ 90 U de MMuLV Reverse Transcriptase (Catherine Desrosiers, Département de microbiologie et d'infectiologie, Université de Sherbrooke) ont été ajoutés aux échantillons. Le volume total des tubes a ensuite été porté à 29,5 μ L avec de l'eau DEPC. Les tubes ont ensuite été incubés à 42°C pendant 1 heure. Deux microlitre des solutions d'ADN obtenues ont ensuite été utilisés pour effectuer une réaction de PCR telle que décrite dans la section 7.1 de ce mémoire. L'amplification d'ADN dérivée des mARN CTD a été vérifiée avec un gel 0,7% d'agarose / TAE.

9.2. Immunobuvardage de type Western

L'expression de la protéine découlée de la construction pLenti CTD a été vérifiée par immunobuvardage de type Western (Western). Afin d'obtenir une concentration élevée en protéines, les premières étapes d'un passage cellulaire décrites à la section 6 ont été effectuées jusqu'à l'obtention du culot cellulaire. Le culot a ensuite été suspendu dans 350 μ L du tampon de lyse pour le tag C-Myc (20 mM Tris, 150 mM chlorure de sodium, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA (SIGMA) et 1% (v/v) Triton X-100 (ICN biomed); pH 7.5) auquel a été ajouté les inhibiteurs de protéases qui suivent: 1 μ g/mL de AEBSF, 1 μ g/mL de leupeptine, 20 μ g/mL d'aprotinine et 0,7 μ g/mL de pepstatine (tous de SIGMA). Les lysats ont ensuite été transférés dans des tubes de 1,5 mL et incubés 30 minutes avec agitation à 4°C. Les tubes ont été centrifugés à une vitesse de 2500 g à 4°C pendant 10 minutes et le surnageant a été prélevé et transféré dans de nouveaux tubes de 1,5 mL. Les

échantillons de protéines ont ensuite été entreposés à -20 °C pour de futures utilisations.

Pour l'immunobuvardage, les échantillons de protéines ont été dosés par Bradford avec le Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD) selon les recommandations du fournisseur (basées sur BRADFORD MM, 1976). De 5 à 10 µg de protéines ont été incubés à 95°C pendant 5 minutes avec du tampon de chargement (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% (m/v) SDS (Invitrogen), 50% (v/v) glycérol, 681 mM β-mercaptoéthanol (Sigma) et rouge de phénol (Fisher Scientific)). Les échantillons de protéines ont ensuite été placés sur des gels SDS-PAGE. Les gels SDS-PAGE utilisés étaient formés d'un gel concentrateur 4% et d'un gel séparateur 7,5 ou 10%. La migration des échantillons a été effectuée environ 1 heure à 150V à température ambiante dans du tampon de migration (25 mM Tris, 0,2 M glycine (WISSENT Inc.), 0,1% (m/v) SDS; pH 8.3). Le buvardage des gels sur une membrane de PVDF a ensuite été effectué dans du tampon de transfert (20% méthanol (EMD), 25 mM Tris et 192 mM glycine). Le transfert a été effectué pendant 1h30 à 300 mA dans une chambre froide à 4°C. Suite au transfert des protéines sur la membrane PVDF, celles-ci ont été bloquées dans un tampon de blocage (5% (m/v) Lait en poudre commercial, 0,001% (v/v) Tween[®] 20 (EMD) / PBS (9,1 mM phosphate de sodium dibasique (J.T. Baker), 1,7 mM phosphate de sodium monobasique (Fisher Scientific), 15 mM chlorure de sodium; pH 7,4)) pendant 1 heure avec agitation à température ambiante. Une dilution adéquate de l'anticorps primaire, anti C-Myc tag, dans du tampon de blocage a ensuite été incubée avec les membranes à 4°C

pour la nuit avec agitation (voir le tableau 6 pour les informations sur les anticorps utilisés lors des expériences de validations). Le lendemain, les membranes ont été lavées à température ambiante à trois reprises avec agitation pendant 15 minutes avec du tampon de lavage (0,001% Tween[®] 20 / PBS). Ensuite, les membranes ont été incubées avec agitation 45 minutes à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé avec une peroxydase du raifort selon la dilution indiquée dans le tableau 6. Les membranes ont encore été lavées à température ambiante avec agitation à trois reprises pendant 15 minutes avec du tampon de lavage. La présence des bandes de protéines recherchées a ensuite été révélée avec le kit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham[™]) en suivant les instructions fournies par le fabricant. Des Kodak Scientific Imaging Film (PerkinElmer Life Sciences) ont été utilisés lors de l'exposition des membranes.

9.3. Immunofluorescence

La validation des constructions a été complétée avec une immunofluorescence (IF) afin de confirmer l'expression et de localiser la protéine qui découlait de la construction pLenti CTD. Ainsi, des lames des différentes populations de cellules ont été préparées de la façon suivante. Dans des Pétris, environ 10% des cellules contenues par un T-75 à 95% de confluence ont été déposées sur des lames Precleaned Micro Slides (Surgipath) dans 1 mL de milieu de culture complet. Les cellules ont été incubées 3 à 5 heures à 37°C et 5% CO₂ afin de permettre leur adhérence à la surface des lames. Après cette période d'incubation, 10 mL de

milieu complet a été ajouté à chaque Pétri contenant les lames et le tout a été remplacé en incubation à 37°C et 5% de CO₂ pour la nuit, ou jusqu'à ce que les cellules sur la lames atteignent une confluence de plus de 70%. Une fois la confluence désirée atteinte par les cellules, les lames ont été lavées à deux reprises avec du PBS pour IF (0,17 M chlorure de sodium, 3,3 mM chlorure de potassium (Fisher Scientific), 10 mM phosphate de sodium dibasique, 1,8 mM phosphate de potassium monobasique; pH 7,4). Les lames ont ensuite été fixées avec une solution de 3,7% de formaldéhyde (Fisher Scientific) / PBS à 4°C pour 15 minutes. Les lames ont été lavées sur une plaque agitatrice avec du PBS à température ambiante pour 10 minutes. Les lames maintenant fixées ont été entreposées à 4°C dans du PBS jusqu'à leur utilisation.

Lors des IF, les lames ont été incubées 30 minutes à température ambiante dans une solution de glycine 0,1 M / PBS. Tout de suite après cette incubation, les cellules fixées sur les lames ont été perméabilisées dans une solution de 0,2% triton / PBS pendant 20 minutes. Les lames ont été rincées avec du PBS à deux reprises pendant 10 minutes sur une plaque agitatrice. Ensuite, les lames ont été bloquées 1 heure dans une solution de 2% Bovine Serum Albumin Fraction V, heat shock (BSA) (Roche) / PBS à température ambiante. Une dilution adéquate de l'anticorps primaire, voir le tableau 6, dans la solution de blocage a ensuite été appliquée sur chacune des lames. Celles-ci ont été incubées 1 heure à température ambiante dans une boîte humide. Sur une plaque agitatrice, les lames ont été lavées à deux reprises avec du PBS pendant 10 minutes à température ambiante. Puisque

l'anticorps secondaire utilisé était couplé à une molécule fluorescente, les étapes subséquentes ont été effectuées à la noirceur. L'anticorps secondaire, voir tableau 6, a été dilué dans la solution de blocage et appliqué à chacune des lames. Les lames ont été incubées 1 heure à température ambiante dans une boîte humide. Suite à cette incubation, les lames ont été placées sur une plaque agitatrice et lavées à deux reprises avec du PBS à température ambiante. Les lames ont été incubées 2 minutes à température ambiante avec une solution de 0,002 % DAPI (Roche) / PBS. Sur une plaque agitatrice, les lames ont été lavées 10 minutes avec du PBS à température ambiante. Une solution de montage (9,25 mM p-phénylènediamine, 10% PBS / glycérol) a ensuite été utilisée pour recouvrir les lames d'une lamelle micro cover glass (VWR). L'excédant de milieu de montage utilisé pour fixer les lamelles a été récupéré en pressant doucement les lames dans du papier absorbant. Les lames ont été analysées à 1000X avec un microscope à fluorescence dans les 24 heures suivant le montage.

Anticorps	Compagnie	Dilution d'utilisation par Western	Dilution d'utilisation par IF
Anti-Myc Tag (souris)	Bioshop Canada Inc.	1 : 1000	1 : 200
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Cell Signaling	1: 3000	
Alexa fluor anti-mouse IgG F(ab') ₂ (chèvre)	Invitrogen		1 : 500

Tableau 6 : Anticorps utilisés lors des validations

10. Comparaison de la morphologie cellulaire

La morphologie des différentes populations infectées avec les lentivirus contrôles et CTD a été analysée quelques passages après leur infection. Lors de la prise de photos, les populations d'une même lignée avaient toutes une confluence similaire ($\pm 10\%$) et, autant que possible, les cellules se trouvaient toutes dans le même genre de contenant depuis le même nombre de passage. Les photos ont été prises avec un objectif à 10X sur un microscope ECLIPSE TS 100 (Nikon corp.) avec un appareil numérique COOLPIX 4500 (Nikon corp.).

11. Formation de foyers post confluence

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits de façon à obtenir une confluence d'approximativement 90% le lendemain. Des photos ont été prises de chaque population cellulaire à tous les jours suite à leur atteinte de la confluence. Le milieu de culture des cellules a été changé régulièrement tout au long de l'expérience. L'expérience a été poursuivie un minimum de 10 jours avec toutes les populations cellulaires. Les photos ont été prises avec un objectif de 4X ou de 10X.

12. Croissance en présence d'ancrage limité

La capacité de plusieurs populations à croître dans un environnement avec peu d'ancrage a été vérifiée. Ainsi, une solution 1,33% d'agar a été mélangée à une

solution de milieu de culture 2X selon un ratio 1 : 1. 1 mL de la solution résultante a rapidement été utilisé pour recouvrir le fond des puits de plaques 6 puits. Les plaques ont été incubées un ou deux minutes à température ambiante pour laisser les solutions d'agar durcir. Ensuite, une solution de 0,66% d'agar a été mélangée à du milieu de culture 2X selon un ratio 1 :1. Rapidement, les cellules à ensemercer ont été suspendues dans un petit volume de milieu et mélangées à la solution d'agar pour obtenir une concentration de 3 000 ou de 5 000 cellules / mL. Un millilitre de la solution d'agar et de cellule a été ajouté à chaque puit, par dessus la première couche d'agar solidifiée. Une fois la deuxième couche d'agar solidifiée, 1 mL de milieu de culture a été ajouté à chacun des puits. Les plaques ont ensuite été placées en incubation pour 1 mois à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu de culture des plaques a été changé à chaque semaine tout au long de cette période. Une fois l'incubation terminée, les colonies visibles à l'œil nu ont été comptées et quelques photos ont été prises à partir de l'objectif de 10X.

13. Formation de sphéroïdes

Les cellules de T-75 ont été récoltées à partir d'une solution de 0,53 mM EDTA / D-PBS (WISSENT Inc.). Une solution de 270 000 cellules / mL a été préparée dans du milieu de culture. Dans le couvercle de Pétris de culture, des gouttelettes de 15 µL de la solution de cellule ont été déposées. 10 mL de PBS a été ajouté dans la base des Pétris de culture et le couvercle a doucement été remis en place. Les Pétris ont été placés en incubation pendant 5 jours à 37°C et à 5 % de CO₂. Des photos

ont été prises le jour même de l'ensemencement des cellules et tous les jours subséquents.

14. Expérience de migration par blessure de la monocouche cellulaire

Les différentes populations cellulaires ont été ensemencées dans des plaques 6 puits de façon à obtenir une densité qui approchait la confluence le lendemain. Une fois la confluence atteinte, un embout de 10 μ L a été utilisé pour faire une croix dans la monocouche cellulaire. Immédiatement, les cellules ont été lavées doucement avec du PBS. Du milieu de culture contenant 40 mM d'hydroxyurée (SIGMA) a été ajouté aux cellules. Cette concentration a préalablement été déterminée comme étant suffisante pour empêcher la prolifération des cellules utilisées sans induire leur mortalité. Les cellules ont été incubées à 37°C et 5 % de CO₂ pendant 48 heures. Des photos de la croix formée dans la monocouche cellulaire ont été prises le jour de son traçage et les jours subséquents.

15. Clonogénicité sur plastique

La clonogénicité sur plastique des cellules a été vérifiée. Ainsi, des quantités de 100, 300 et 500 cellules des différentes populations ont été ensemencées dans différents puits d'une plaque 6 puits. Les cellules ont été incubées dans 2 mL de milieu de culture pour une période de 14 jours à 37°C et 5% de CO₂. Suite à cette

incubation, les cellules ont été rincées au PBS et fixées lors d'une incubation de 10 minutes à -20°C en présence de 1 mL de méthanol froid. Le méthanol a été retiré et 1 mL d'une solution de 0,1% de cristal violet (Aldrich Chemical Company inc.) / éthanol (Les Alcools de Commerce) a été ajouté à chaque puit. Les cellules ont été incubées 15 minutes à température ambiante puis rincées à deux reprises avec de l'eau distillée. Les colonies de plus de 50 cellules ont été comptées et des photos de colonies typiques ont été prise avec l'objectif 4X.

16. Sensibilité au cisplatine

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits afin d'obtenir une confluence d'environ 70% le lendemain. Les cellules ont été incubées avec des concentrations de cisplatine (Mayne Pharma) qui variaient entre 0,4 µg/mL et 3 µg/mL. Les effets du cisplatine sur les cellules ont été suivis visuellement à l'aide d'un microscope. Des photos ont été prises après 72 heures d'incubation avec 2 µg/mL de cisplatine.

17. Microscopie électronique à transmission

Les cellules des différentes populations ont étéensemencées dans des Pétris de culture de 35 mm x 10 mm. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5 % de CO₂ jusqu'à l'atteinte de la confluence. Les cellules ont ensuite été remises à Denis G. Martel, technicien en microscopie électronique du département d'anatomie et

biologie cellulaire, pour leur préparation à la microscopie électronique. Une fois les coupes de cellules terminées, celles-ci ont été observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission H-7500 (HITACHI). Des photos ont été prises à des grossissements de 60 000x, de 70 000x ou de 80 000x.

18. Immunofluorescence

Le protocole utilisé est décrit à la section 9.3 de ce mémoire. Il est à noter que lors de la détection de la F-actine, une solution de Phalloidin-TRITC P1951 (SIGMA) diluée 1 : 1300 avec de la solution de blocage a été utilisée. Aucun anticorps secondaire n'était requis avec la solution de phalloidin. Ainsi, l'étape d'incubation avec l'anticorps secondaire a donc été omise lors de la détection de la F-actin. Des IF pour la détection de CA125, de E-cadhérine, de N-cadhérine, des cytokératines 8 et 18, de la vimentine, de la β -actine, de p120 et de la F-actine ont été effectuées. Les anticorps primaires et secondaires utilisés lors des ces IF sont décrits dans le tableau 7.

Anticorps (primaires et secondaires)	Compagnie	Dilution
Anti-human CA125 clone M11 (souris)	DakoCytomation	1 : 500
Anti-Human E-cadherin (souris)	Chemicon International	1 : 800
Anti-N-cadherin (souris)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 500
Anti-Cytokeratin 8 & 18 (souris)	ZYMED Laboratories Inc.	1 : 10
Anti-Vimentin (V9) (souris)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 300
Anti- β -catenin (E-5) (souris)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 800
Alexa fluor goat anti-mouse IgG F(ab') ₂	Invitrogen	1 : 500

Tableau 7 : Anticorps utilisés lors des immunofluorescences

19. Formation de tumeurs chez des souris

Les différentes populations SKOV-3 ont été injectées à des souris NUDE CD1 (Charles River) et à des souris SCID CB17 (Charles River). Les souris NUDE CD1 sont des souris dépourvues de thymus et donc de lymphocytes T matures. Ces souris immunodéficientes au niveau de leur système immunitaire adaptatif sont également dépourvues de pelage. Les souris SCID (severe combined immunodeficiency) sont des souris dont le système immunitaire est sévèrement affecté par l'absence de lymphocytes B et T matures et de thymus. Chez ces souris, le système immunitaire adaptatif et l'activation du système du complément ne fonctionnent pas. Les différentes populations de cellules en culture ont été concentrées en suivant le protocole de passage cellulaire. Une fois le culot de cellule obtenu, les cellules ont été lavées dans du milieu de culture non complété.

Les cellules ont ensuite été suspendues dans du milieu de culture et les décomptes cellulaires nécessaires ont été effectués à l'aide d'une hémacymètre. Chez les souris NUDE, 4,5 millions de cellules en suspension dans 100 μ L de leur milieu de culture (non complété) ont été injectées de façon sous cutanée à quatre endroits sur le dos des souris. La croissance des tumeurs formées a été suivie jusqu'à ce les tumeurs formées par l'un des groupes de souris atteignent environ 1 cm³. Les souris ont alors été euthanasiées et disséquées. Chez les souris SCID, 200 millions de cellules en suspension dans 200 μ L de leur milieu de culture (non complété) ont été injectées de façon intrapéritonéale. Les souris ont ensuite été suivies jusqu'à leur décès et disséquées. Toutes les expériences effectuées chez les souris ont été réalisées en suivant le protocole 112-02 approuvées par le Comité d'éthique de l'expérimentation animale de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke.

20. Western

Des T-75 des différentes populations ont été rincés avec du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées 30 minutes sur une plaque agitatrice à 4°C en présence de 1 mL de tampon de lyse pour le tag Myc. Les cellules des T-75 ont été décollées à l'aide de grattoirs et la solution cellulaire a été récupérée dans des tubes de 1,5 mL. Les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 2500 g à 4°C puis, le surnageant des tubes a été prélevé et transféré dans de nouveaux tubes de 1,5 mL. Les échantillons de protéines ont ensuite été congelés à -20 °C jusqu'à leur utilisation. Cinq

microgrammes de protéines de chaque échantillon a été mis sur gel et un Western a été effectué en suivant le protocole de la section 9.2 de ce mémoire. Les anticorps utilisés se retrouvent dans le tableau 8.

21. Exposition des cellules au HGF

Des OVN 95T hTERT ont étéensemencées dans des plaques 6 puits afin d'obtenir une confluence d'environ 40% le lendemain. Les cellules ont été traitées selon l'une de trois conditions. Le milieu de culture de toutes les cellules a été remplacé par du milieu de culture sans sérum et sans β -estradiol et un premier tiers de cellules ont été incubées 24 heures en présence de 20 ng/mL de HGF (MJS BioLynx Inc.) pour l'une des conditions expérimentales. Vingt-trois heures plus tard, un deuxième tiers de cellules ont été incubées en présence de 20 ng/mL de HGF pendant 5 minutes pour la deuxième condition expérimentale. Aucun produit n'a été ajouté aux cellules restantes afin de s'en servir comme contrôle. Suite aux incubations, les protéines des cellules ont été extraites avec 150 μ L / puit de tampon de lyse NP-40 (0,28 M chlorure de potassium, 10 mM $MgCl_2$ (Fisher Scientific), 50 mM Hepes pH 7,5, 4 mM EGTA, 0.6 % Nonidet P40 (Roche)) selon le protocole décrit à la section 19 de ce mémoire. Les échantillons recueillis ont ensuite été immédiatement utilisés pour un Western selon le protocole décrit à la section 9.2. Environ 10 μ g de protéines de chaque échantillon a été mis sur gel. Les effets de l'exposition au HGF sur l'expression de AKT, de la phosphorylation d'AKT, de

Met, et de certaines phosphorylations de Met ont ensuite été analysés. Les anticorps utilisés et leurs conditions d'utilisation sont décrits dans le tableau 8.

Anticorps	Compagnies	Dilutions
Anti-N-cadherin (souris)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 700
Anti-E-cadherin (souris)	BD Bioscience	1 : 2500
Anti-AKT (lapin)	Cell Signaling	1 : 1000
Anti-phospho AKT (lapin)	Cell Signaling	1 : 500
Anti-cMet (lapin)	ZYMED Laboratories	1 : 1000
Anti-Met pY1003 (souris)	Invitrogen	1 : 1000
Anti-Met pY1230-34-35 (souris)	Invitrogen	1 : 1000
Anti-GAPDH (souris)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 30 000
Anti- α Tubulin (souris)	SIGMA	1 : 10 000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 3000
Anti-mouse IgG, HRP-linked	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1 : 3000

Tableau 8 : Anticorps utilisés lors des expériences de Western

Résultats

22. Expériences sur les populations SKOV-3

Plusieurs expériences ont été effectuées sur les populations SKOV-3 établies et décrites dans le cadre du mémoire de Marianne Boivin (BOIVIN, 2005). Lors d'expériences précédentes effectuées sur ces cellules dans notre laboratoire, la présence du CTD de CA125 semblait augmenter la résistance des cellules à différents agents chimiothérapeutiques induisant des dommages à l'ADN (BOIVIN, 2005). Pour faire suite à ces expériences, les effets du CTD sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité ont été évalués.

23. Évaluation de la vitesse de croissance

Une expérience visant à évaluer la vitesse de croissance des différentes populations SKOV-3 a été effectuée (figure 16). Selon les résultats obtenus, la vitesse de croissance des populations contrôles SKOV-3 et SKOV-3 EV était comparable à celle observée chez la population SKOV-3 CTD. Cependant, la population SKOV-3 CTD semblait atteindre son plateau de croissance plus tardivement que les autres populations. Visuellement, les cellules de la population SKOV-3 CTD semblaient être en mesure de s'entasser plus facilement que les populations contrôles une fois la confluence atteinte (données non illustrées).

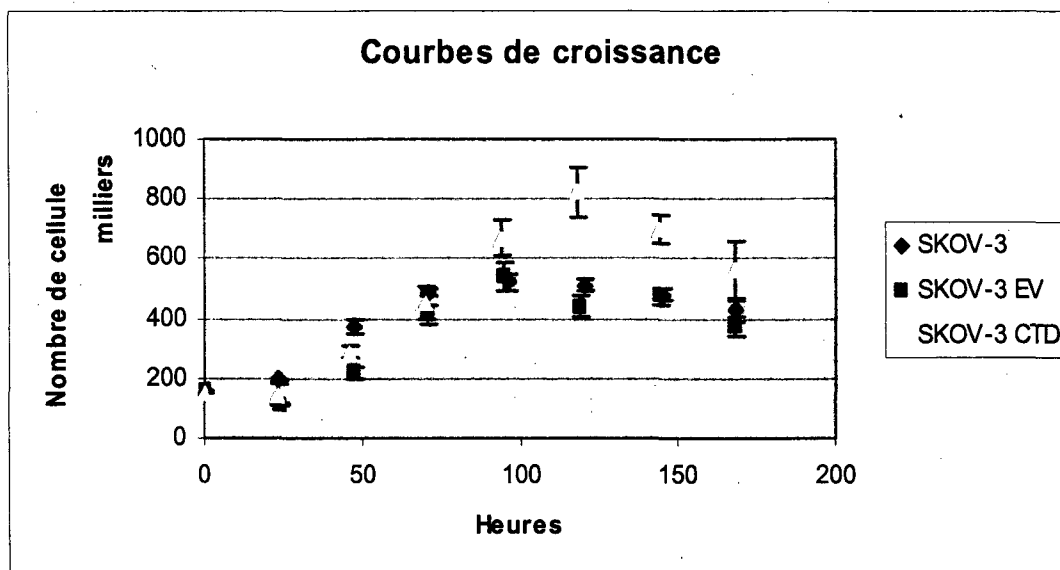


Figure 16 : Vitesse de croissance des cellules

Quantité de cellules présentes en moyenne dans les puits de plaques de 6 puits à des intervalles de 24 heures. Lors de l'expérience, les cellules ont été incubées selon leurs conditions habituelles de culture soit 37°C et 5% de CO₂. Les losanges bleus représentent les données de la population parentale SKOV-3; les carrés roses représentent les données de la population contrôle SKOV-3 EV; les triangles jaunes représentent les données de la population qui exprime la portion CTD de CA125 les SKOV-3 CTD. N = 6.

24. Formation de foyers post-confluence

Une expérience de formation de foyers post-confluence a été effectuée avec les différentes populations SKOV-3. Toutes les populations SKOV-3 semblaient en mesure de faire des foyers de croissance suite à l'atteinte de la confluence. L'apparition des foyers de croissance post-confluence se faisait plus rapidement chez la population SKOV-3 CTD comparativement aux populations contrôles (figure 17). Après quatre jours à confluence, les SKOV-3 CTD commençaient déjà à former des foyers alors que les populations contrôles ont commencé à former de

petits foyers qu'après sept jours de croissance à confluence. De plus, une plus grande quantité de foyers post-confluence a été observée chez la population SKOV-3 CTD. Finalement, les foyers de croissance formés par la population SKOV-3 CTD étaient généralement d'une taille supérieure à ceux retrouvés chez les populations contrôles.

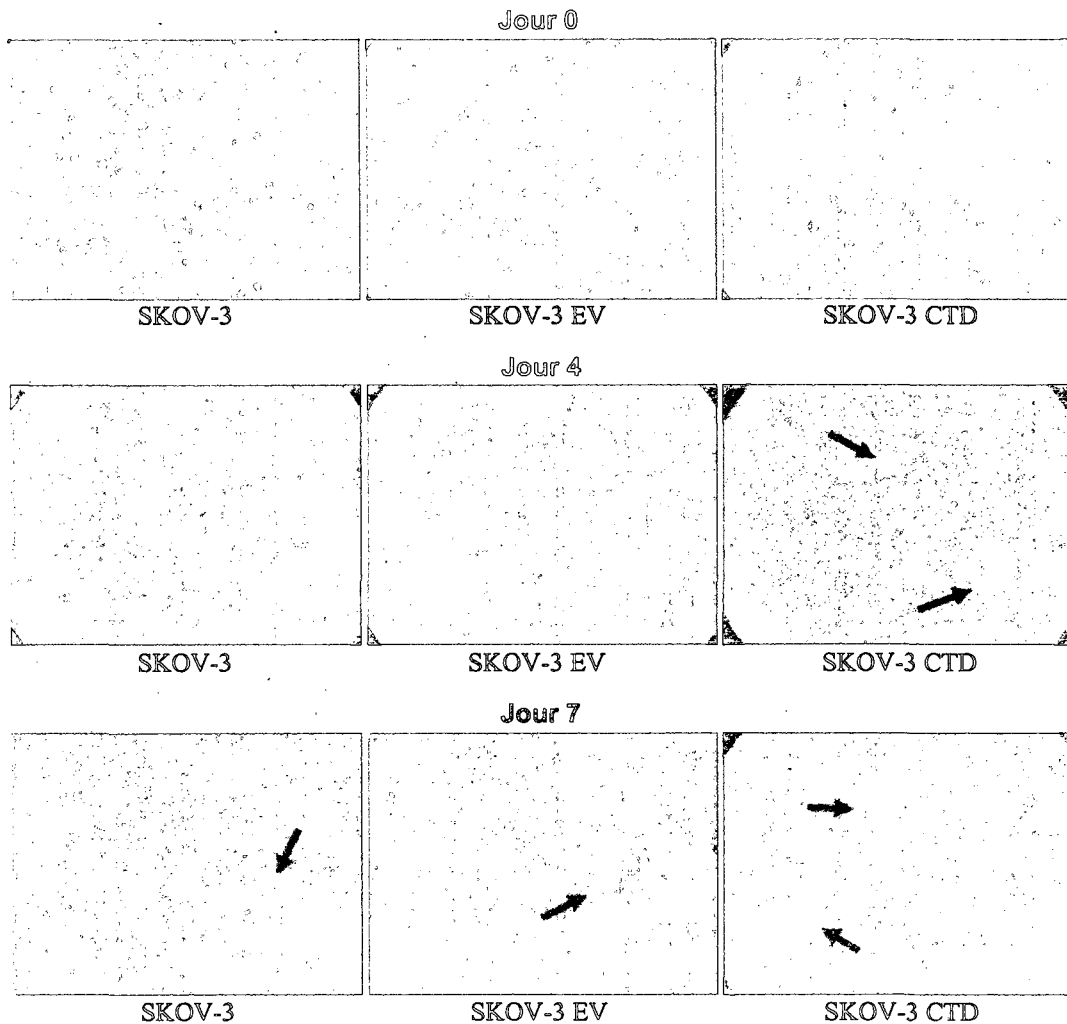


Figure 17 : Formation de foyers post-confluence

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits et incubées selon leurs conditions habituelles de culture soit 37°C et 5% de CO₂. Des photos à 100X ont été prises lors de l'atteinte de la confluence (Jour 0), quatre jours après l'atteinte de la confluence (Jour 4) et sept jours après l'atteinte de la confluence (Jour 7). Les flèches désignent les endroits où des foyers de croissance sont visibles. N = 3.

25. Croissance en présence d'ancrage limité

La capacité des différentes populations SKOV-3 à croître en agar mou a été évaluée. Toutes les populations SKOV-3 étaient en mesure de former des colonies en agar mou. Un nombre significativement plus élevé de colonies ($p = 0,0005$) a été observé chez la population SKOV-3 CTD (figure 18). Cette différence correspond à une augmentation du nombre de colonies de l'ordre de 215% à 248% chez la population SKOV-3 CTD lorsque comparée aux populations contrôles. Également, les colonies visibles chez les SKOV-3 CTD étaient généralement d'une plus grande taille que celles retrouvées chez les populations contrôles (figure 19).

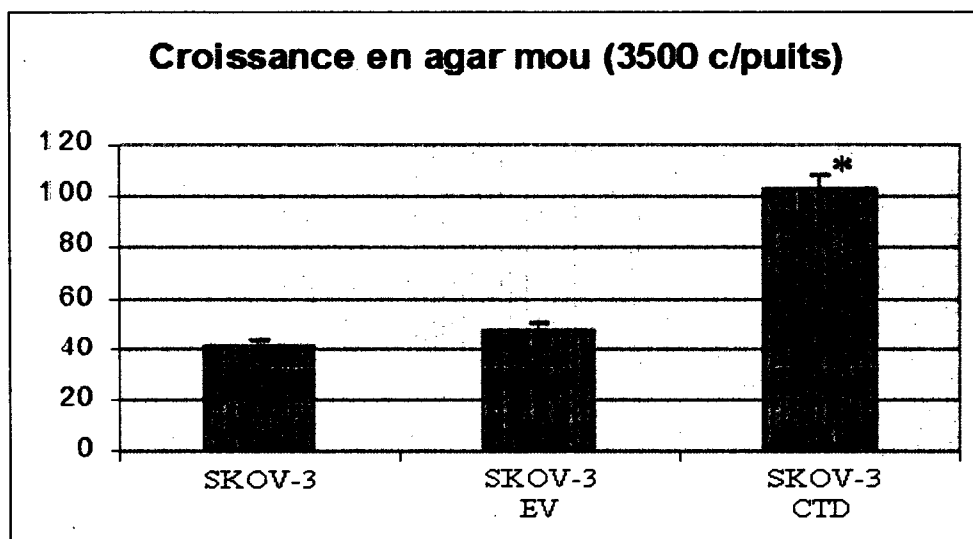


Figure 18 : Nombre de colonies formées en agar mou chez les différentes populations SKOV-3
Nombre moyen de colonies formées chez les différentes populations SKOV-3. Seules les colonies de plus de 10 cellules ont été comptées. Les cellules ont été incubées dans une matrice d'agar 0,33% et de milieu de culture. Les cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant un mois.
* résultats significatifs à $p = 0,0005$. N = 3.

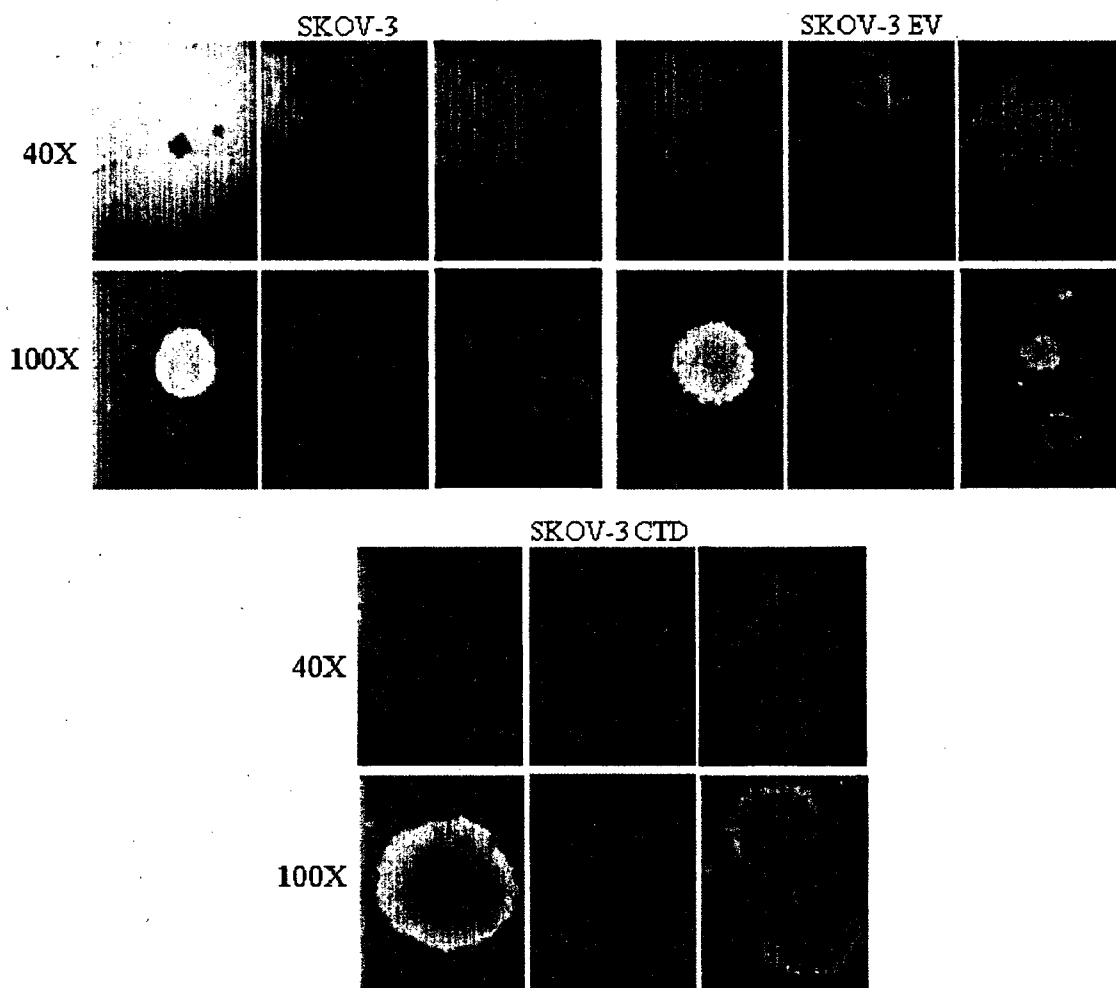


Figure 19 : Taille des colonies formées en agar mou

Photos à 40X et 100X de colonies formées par les différentes populations SKOV-3 après un mois d'incubation. Les cellules ont été incubées dans une matrice d'agar 0,33% et de milieu de culture. Les cellules ont été incubées à 37°C et 5% de CO₂.

26. Croissance des différentes populations SKOV-3 chez les souris

NUDE

La capacité des différentes populations à former des tumeurs sous-cutanées chez les souris NUDE a été évaluée. La taille des tumeurs formées par la population

SKOV-3 CTD était nettement supérieure à celle des populations contrôles SKOV-3 et SKOV-3 EV. À cause de la grande taille des tumeurs présentes chez les souris injectées avec la population SKOV-3 CTD (souris CTD), toutes les souris ont été euthanasiées 17 jours après les injections. Les souris ont ensuite été disséquées et les tumeurs formées ont été récupérées et pesées. La masse moyenne des tumeurs retrouvées chez les souris CTD était significativement supérieure ($p = 0,0001$) à celles des populations contrôles (figure 20). Ainsi, la masse moyenne des tumeurs formées par la population CTD était de 0,158g à 0,164g supérieure à celles formées par les populations contrôles.

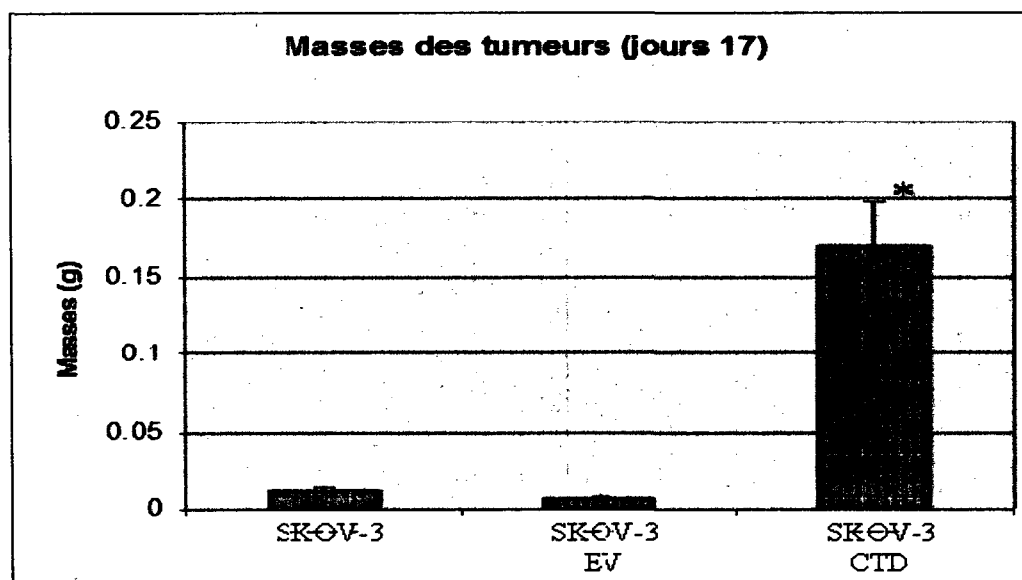


Figure 20 : Masses des tumeurs formées chez les souris NUDE par les différentes populations SKOV-3

Lors de chaque expérience, trois à quatre souris NUDE ont été inoculées de façon sous cutanée avec 4,5 millions de cellule de la population parentale SKOV-3, de la population contrôle SKOV-3 EV ou de la population expérimentale CTD. La figure illustre la masse moyenne des tumeurs sous-cutanées extraites des souris NUDE suite à leur euthanasie. Les souris ont été euthanasiées 17 jours après l'injection des différentes populations SKOV-3. Les données proviennent de deux expériences distinctes et comprennent 14 tumeurs prélevées à quatre souris SKOV-3, 13 tumeurs prélevées à quatre souris SKOV-3 EV et 11 tumeurs prélevées à quatre souris SKOV-3 CTD.

27. Croissance des différentes populations SKOV-3 dans la cavité intrapéritonéale de souris SCID

La croissance intrapéritonéale des populations SKOV-3 a été évaluée chez les souris SCID. Le temps de survie des souris après l'injection des différentes populations SKOV-3 a été mesuré. La quantité et la masse totale des implants macroscopiques ont également été vérifiées chez les différentes souris. Les résultats obtenus indiquent que le temps de survie des souris injectées avec la population SKOV-3 CTD (souris CTD) était plus court que celui des souris injectées avec les populations contrôles (souris SKOV-3 et souris EV) (figure 21). À la mort des deux premières souris CTD, soit au 27^{ième} jour de l'expérience, deux souris contrôles ont été euthanasiées afin de comparer la quantité d'implants macroscopiques présents. La quantité d'implants macroscopiques retrouvée chez les souris CTD était plus importante que chez les souris SKOV-3 et les souris EV (figure 22). Également, en moyenne, la masse totale des implants macroscopiques retrouvés chez les souris CTD était nettement supérieure à celle des souris SKOV-3 et des souris EV (figure 23). La masse moyenne des implants macroscopiques retrouvés chez les souris CTD était de 861% à 959% supérieure à celles retrouvées chez les souris contrôles.

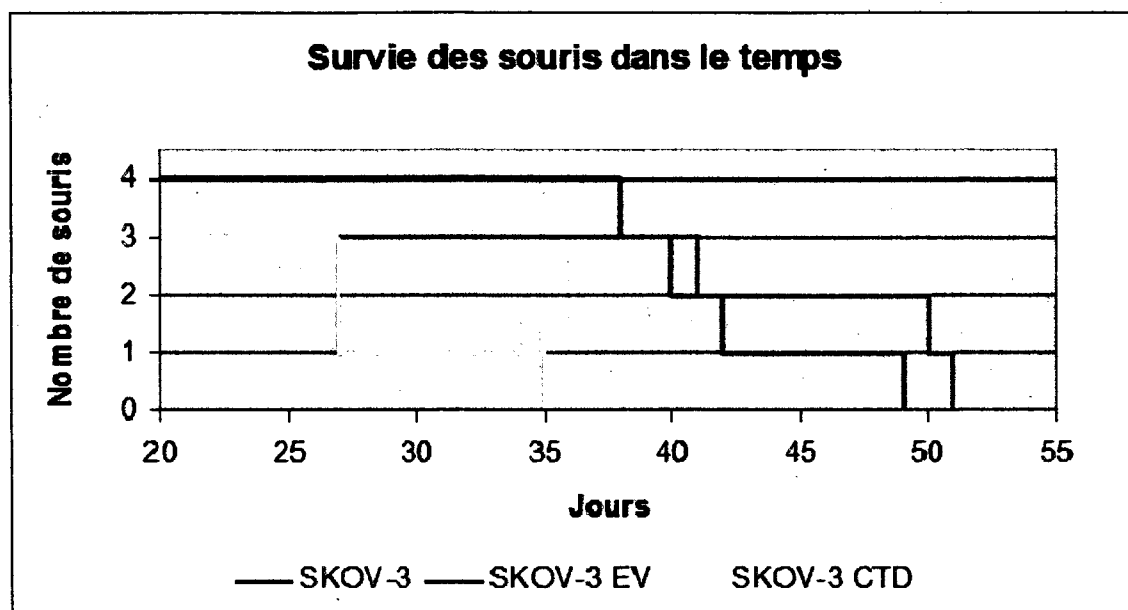


Figure 21 : Temps de survie des souris injectées de façon intrapéritonéale avec les différentes populations SKOV-3

Trois à cinq souris ont été inoculées de façon intrapéritonéale avec 200 millions de cellules de la population parentale SKOV-3, de la population contrôle SKOV-3 EV ou de la population expérimentale SKOV-3 CTD. Les souris ont été suivies jusqu'à leur décès. Temps de survie des souris SKOV-3 (en bleu), des souris EV (en rose) et des souris CTD (en jaune). N = 1.

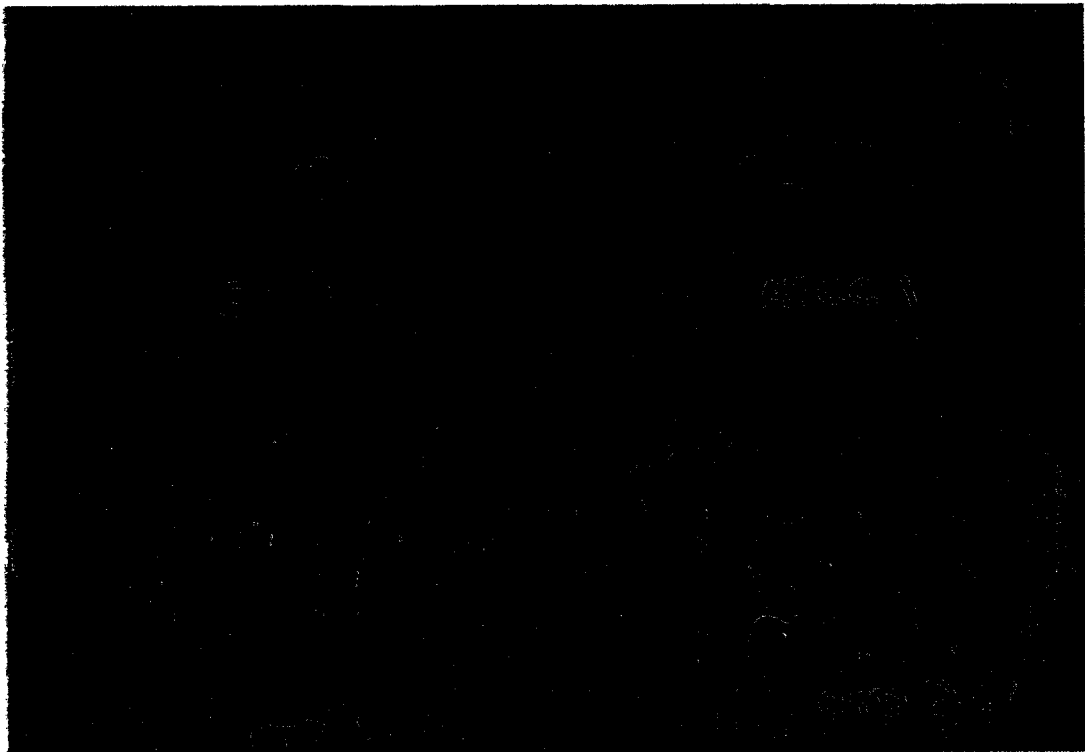


Figure 22 : Quantité d'implants macroscopiques retrouvée chez différentes souris injectées de façon intrapéritonéale avec les différentes populations SKOV-3

Implants macroscopiques extraits des premières souris CTD mortes au jour 27 et de souris contrôles SKOV-3 et EV. Les souris contrôles SKOV-3 et EV ont été euthanasiées au jour 27 de l'expérience pour des fins de comparaison avec les souris CTD. Toutes les souris avaient été inoculées de façon intrapéritonéale avec 200 millions de cellules de la population parentale SKOV-3, de la population contrôle SKOV-3 EV ou de la population expérimentale SKOV-3 CTD.

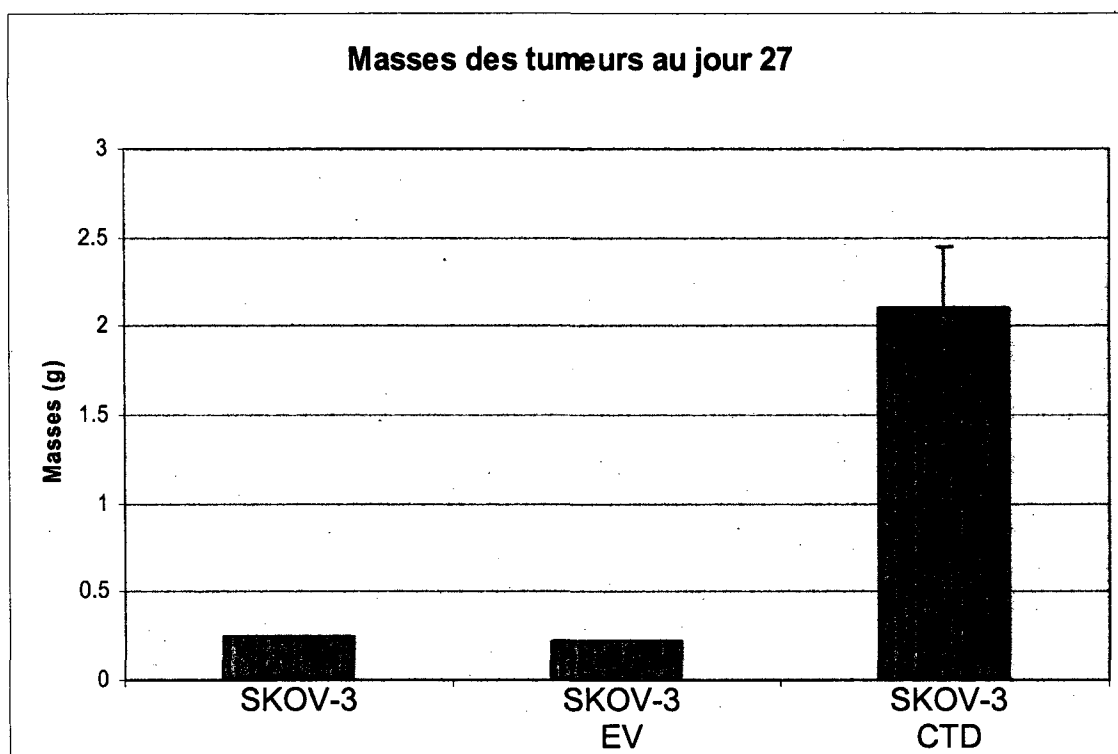


Figure 23 : Masse des implants macroscopiques retrouvées chez différentes souris injectées de façon intrapéritonéale avec les différentes populations SKOV-3

Masse des implants macroscopiques extraits des souris CTD mortes au jour 27 et de souris SKOV-3 et EV. Les souris contrôles SKOV-3 et EV ont été euthanasiées au jour 27 de l'expérience pour des fins de comparaison avec les souris CTD. Toutes les souris avaient été inoculées de façon intrapéritonéale avec 200 millions de cellules de la population parentale SKOV-3, de la population contrôle SKOV-3 EV ou de la population expérimentale SKOV-3 CTD. N=2.

28. Construction du vecteur pLenti CTD

Suite aux résultats obtenus avec les populations SKOV-3, il a été décidé de vérifier si la portion CTD de CA125 était en mesure de transformer des cellules immortalisées ou non et d'influencer différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité. Afin de faciliter l'établissement de populations stables chez

différentes cellules dotées de potentiels de transfection variables, un système d'expression lentiviral a été mis sur pied. Le vecteur pLenti CTD utilisé pour la formation des lentivirus CTD2 a été construit selon les étapes décrites dans les sections 7.1 à 7.4. L'insert CTD a tout d'abord été amplifié à partir du plasmide pSTCF CTD dont la construction est décrite dans BOIVIN 2005. Les amorces utilisées lors de cette amplification ont permis l'ajout des sites de restriction BamHI en 5' et EcoRV en 3' (revoir la figure 14). L'insert CTD amplifié et le vecteur pLenti6V5/Adapteur ont ensuite été digérés avec les enzymes BamHI et EcoRV. Les deux fragments d'ADN digérés ont ensuite été ligués. Les vecteurs résultants ont ensuite été utilisés pour transformer des STBL-3 compétentes.

Des minipreps ont ensuite été effectués sur 26 des colonies obtenues suite à la transformation. Après avoir rencontré plusieurs problèmes de mutations au niveau du plasmide recombinant, la morphologie des colonies piquées a été prise en considération. Les colonies associées à un chiffre impair étaient d'une grande taille alors que les colonies associées à un chiffre pair étaient d'une petite taille ou d'une taille moyenne. Une fraction de l'ADN obtenu a ensuite été placée sur gel d'agarose afin d'observer la présence de l'insert et l'absence de mutation (figure 24). Les clones dérivés de colonies de grandes tailles (clones impairs) semblaient avoir subi une mutation caractérisée par une diminution de la taille du plasmide recombinant par rapport au plasmide pLenti6V5 de base. D'autres mutations sont également observées chez les clones de petites tailles et de tailles moyennes (clones

numérotés avec des chiffres pairs). Seul le clone pLenti CTD2 contenait l'insert CTD sans avoir subi de mutations.

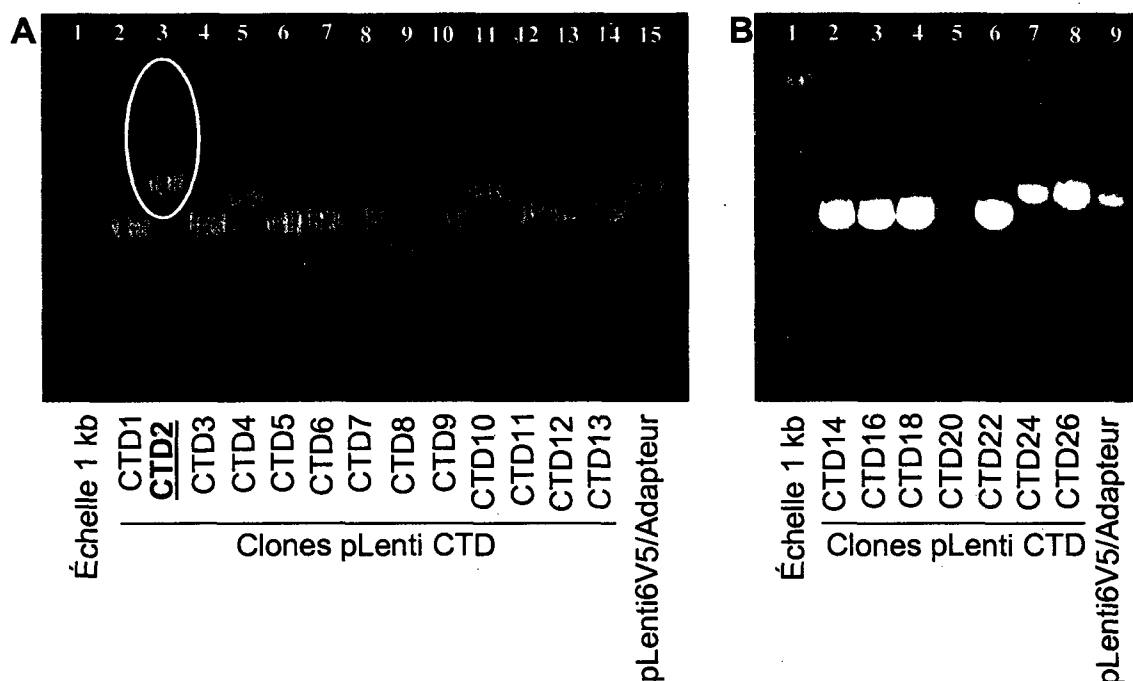


Figure 24 : Minipreps de colonies transformées par des pLenti6V5/Adapteur CTD

1 μ L de l'ADN des différents minipreps indiqués au bas de chacune des pistes a été placé sur un gel 0,7% d'agarose / TAE. **A** : Gel d'agarose qui comprend les clones pairs et impairs pLenti CTD de 1 à 13. **B** : Gel d'agarose qui comprend les clones pairs pLenti CTD de 14 à 26. Le clone positif pLenti CTD2 est encerclé en blanc.

La réaction de PCR, décrite dans la section 7.1 a été effectuée afin de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide pLenti CTD2. L'ADN amplifiée par PCR a été placée sur un gel d'agarose 0,7% / TAE. Selon ce gel, figure 25, le clone pLenti CTD2 semblait bel et bien contenir l'insert CTD. Le gel a aussi indiqué la présence de l'insert CTD chez les constructions mutées pLenti CTD3 et pLenti CTD26. La présence d'une mutation dans ces plasmides a empêché leur utilisation.

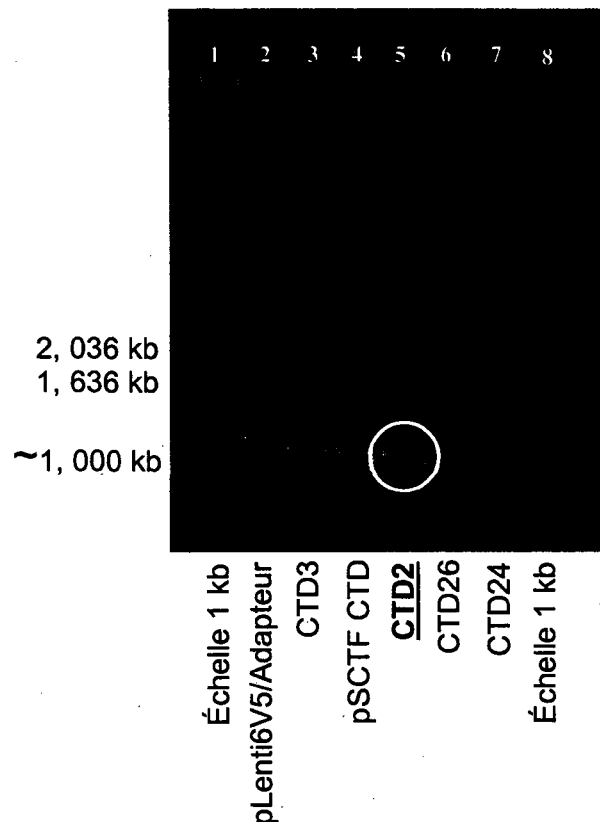


Figure 25 : Validation du clone pLenti CTD2

Gel effectué sur les produits du PCR effectué pour valider la présence de l'insert CTD chez le clone pLenti CTD2 (couloir 5). Le plasmide de base pLenti6V5/Adapteur (couloir 2) a servi de contrôle négatif pour la réaction de PCR et le plasmide pSCTF CTD (couloir 4) a servi de contrôle positif.

Le plasmide pLenti CTD2 a ensuite été amplifié à partir de minipreps puisque les constructions pLenti sont difficilement amplifiables par maxipreps. Le plasmide a pLenti CTD2 a ensuite été séquencé.

Suite à la vérification de la séquence du plasmide, l'ADN amplifiée a été utilisée pour former le lentivirus CTD2 selon les étapes décrites à la section 7.5. Les lentivirus contrôles GFP et Cyto6 (le Cyto6 est une construction de la portion cytoplasmique de CA125 dont l'expression protéique fait défaut) ont également été

créés en suivant ce protocole. Le plasmide pLenti Cyto6 a été construit de la même façon que le pLenti CTD2. À l'exception de la séquence de signalisation IgK leader et d'une séquence plus courte de la protéine CA125 (la portion cytoplasmique de la protéine), cette construction contient les mêmes éléments que la construction CTD2. Puisque qu'aucune expression protéique n'a été observée à partir de cette construction, les lentivirus pLenti Cyto6 ont été utilisés comme contrôles tout comme les vecteurs pLenti GFP. La nomenclature utilisée pour identifier chacune des populations créées à partir des lentivirus est expliquée à la figure 26. Chez chaque lignée cellulaire étudiée, deux à quatre populations contrôles GFP et Cyto6 ainsi que deux à quatre populations expérimentales CTD2 ont été établies. La lignée parentale a également été conservée et utilisée en tant que population contrôle.

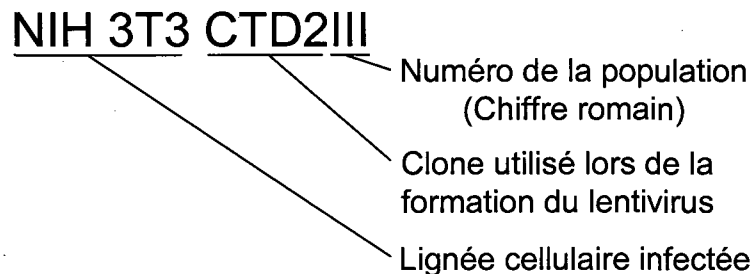


Figure 26 : Nomenclature utilisée pour les populations établies

29. Infection et validation des lignées cellulaires non-transformées immortalisées ou non HFL-1 et NIH 3T3

Afin de vérifier la capacité de la portion CTD de CA125 à transformer des cellules immortalisées ou non ou à leur conférer des caractéristiques de cellules cancéreuses, les lignées cellulaires NIH 3T3 et HFL-1 ont été infectées avec les lentivirus. Une première évaluation de l'efficacité des infections a été effectuée lors de l'observation de l'expression de la GFP chez les populations contrôles GFP. Ainsi, selon cette vérification, l'infection lentivirale de la lignée NIH 3T3 ne semble pas avoir été très efficace. Le pourcentage de cellules qui exprimait la GFP chez cette lignée était de l'ordre de 2 % et la plupart des cellules qui exprimaient la GFP ne l'exprimaient que faiblement (figure 27A). Toutefois, l'efficacité d'infection des HFL-1 semble avoir été près de 99% et la majorité des cellules exprimait fortement la protéine (figure 27B).

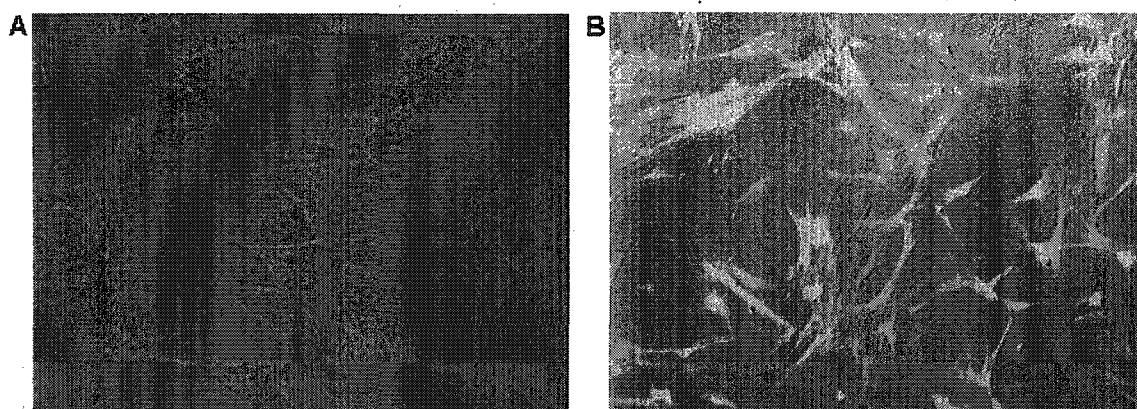


Figure 27 : Efficacité d'infection des NIH 3T3 et des HFL-1

Des photos des populations NIH 3T3 GFP et des HFL-1 GFP ont été prises à 400X. Les photos ci-dessous ont été prises 3 jours après l'infection des cellules. A : NIH 3T3 GFPI, B : HFL-1 GFPII.

Suite à la sélection des différentes populations établies, la morphologie des différentes populations NIH 3T3 et des populations HFL-1 a été comparée et photographiée. Aucune différence de morphologie n'a été observée entre les différentes populations NIH 3T3 (figure 28B et figure 28D). Chez les populations HFL-1 CTD2, la présence du CTD semble avoir entraînée un léger allongement des cellules et ce, malgré la morphologie déjà fibroblastique des cellules (figure 28A et figure 28C).

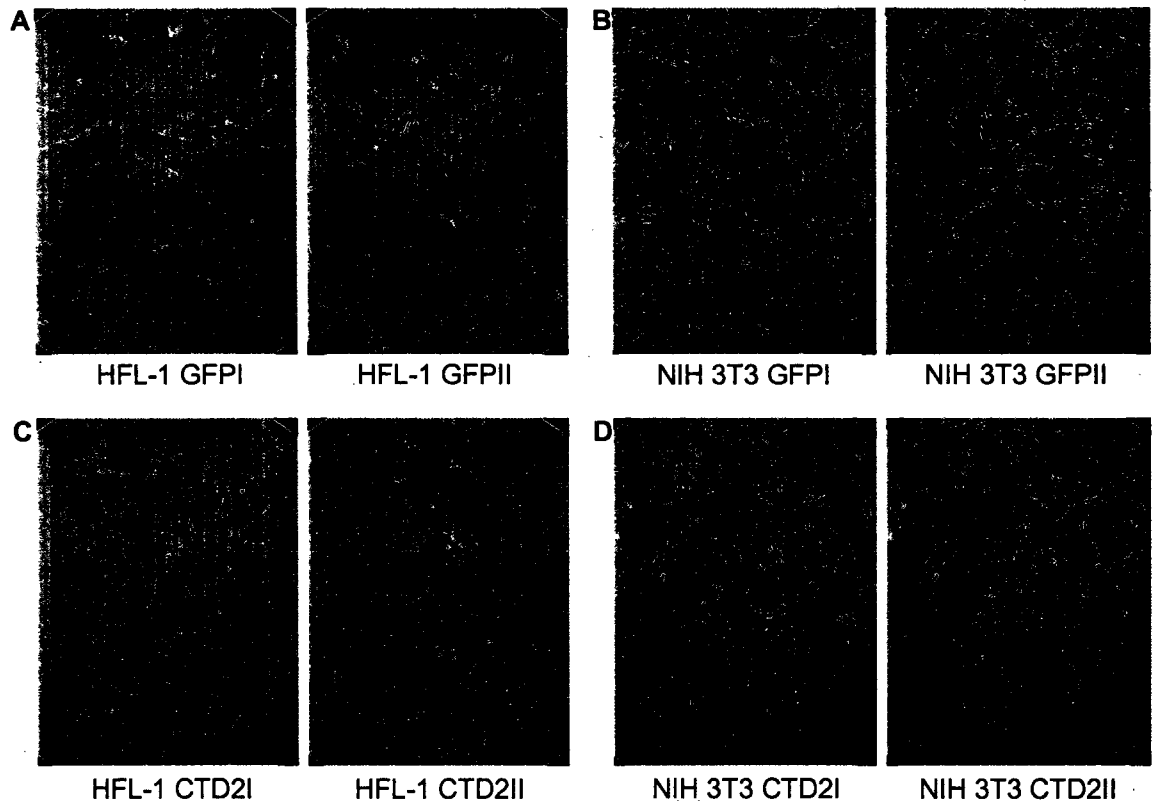


Figure 28 : Morphologie des différentes populations NIH 3T3 et HFL-1

Les photos des différentes populations ont été prises à 100X. A et C : Populations HFL-1 de passages 2 à 3. B et D : Populations NIH 3T3 de passages 3 à 5.

Des expériences de validation des différentes populations ont ensuite été effectuées. Ces expériences visaient à confirmer l'absence de la construction CTD chez les différentes populations contrôles et une expression adéquate de la construction CTD chez les populations CTD. L'expression de la construction CTD2 a d'abord été vérifiée au niveau de la transcription à partir d'un RT PCR. Les résultats obtenus sont illustrés à la figure 29. Ainsi, la population NIH 3T3 CTD2 I ne semblait pas exprimer la construction CTD et on ne pouvait observer qu'une très faible expression de la construction chez la population NIH 3T3 CTD2 II (figure 29A). En ce qui a trait aux populations HFL-1, les deux populations CTD2 semblaient exprimer la construction (figure 29B).

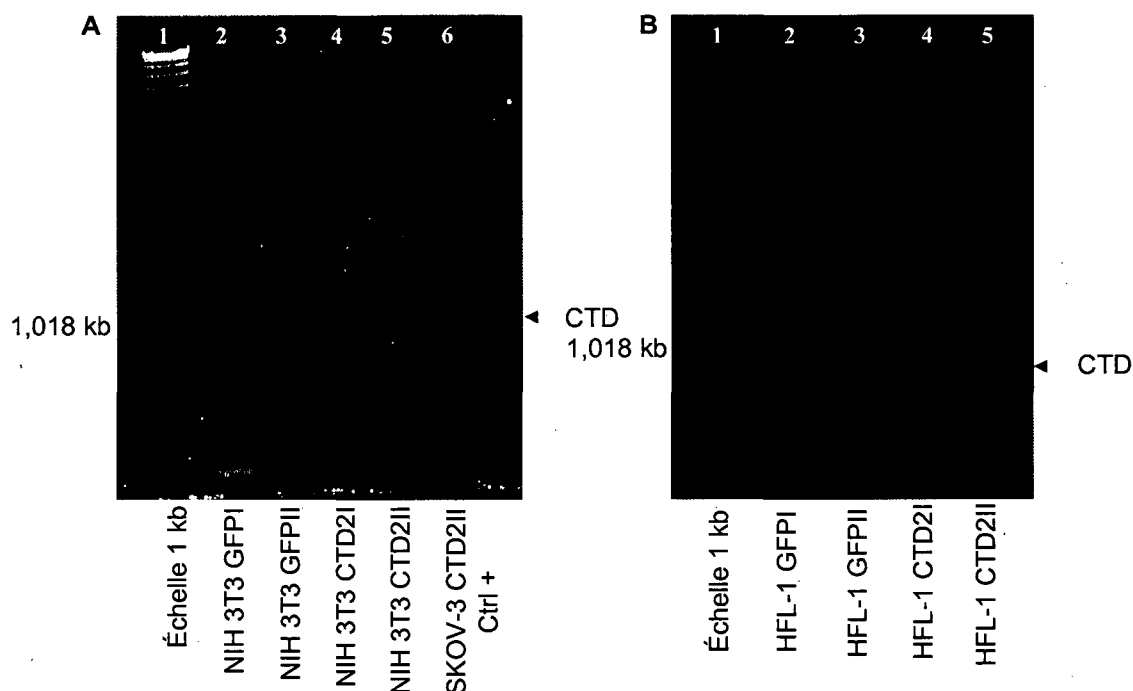


Figure 29 : Validation des populations NIH 3T3 CTD2 et HFL-1 CTD2 par RT PCR

Les produits du RT PCR ont été placés sur un gel de 0,7% agarose / TAE. L'expression de l'ARN de la construction CTD a été validée chez les deux populations HFL-1 CTD2 (illustration B, couloirs 4 et 5) et une très faible expression a été observée chez la population NIH 3T3 CTD2II (illustration A, couloir 5) **A** : Résultats du RT PCR chez les populations de la lignée NIH 3T3 indiquées au bas de l'illustration. **B** : Résultats du RT PCR chez les populations HFL-1 indiquées au bas de l'illustration.

L'expression de la construction CTD2 a ensuite été validée au niveau protéique.

Un immunobuvardage de type Western a été effectué tel que décrit dans la section

9.2. Ainsi, chez la lignée NIH 3T3, des bandes non spécifiques à la hauteur de la

construction CTD rendent l'évaluation difficile (figure 30). Puisque les bandes

retrouvées à la hauteur théorique du CTD étaient présentes chez les populations

contrôles et chez les populations CTD2, ces bandes ont été considérées comme des

bandes non spécifiques. Ces observations semblent indiquer que les constructions

CTD ne sont pas exprimées adéquatement chez les NIH 3T3. Chez les populations HFL-1, de fortes bandes sont présentes uniquement chez les CTD. En fait, ces bandes ont été retrouvées chez toutes les populations CTD dérivées de cellules non-transformées et chez les populations CTD dérivées de cellules non-transformées immortalisées par la télomérase. Les bandes retrouvées chez ces populations représentaient vraisemblablement la construction CTD2 exprimée par ces populations.

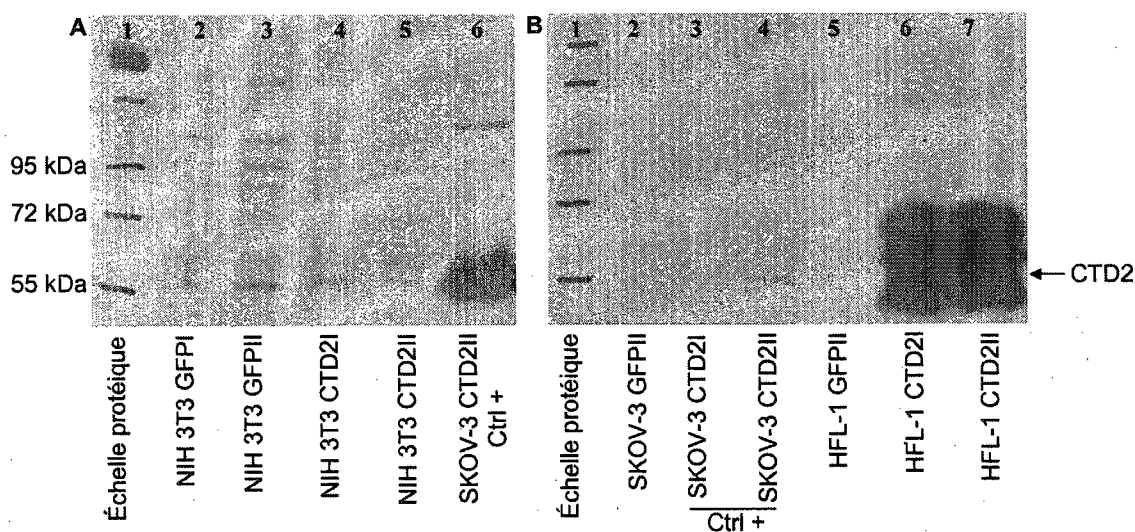


Figure 30 : Immunobuvardage de type Western pour la validation des populations CTD2

Les extraits protéiques des différentes populations indiquées au bas du gel ont été placés sur des gels 7,5% d'acrylamide. L'expression de la protéine CTD a été validée chez les deux populations HFL-1 CTD2 mais non chez les deux populations NIH 3T3 CTD2. A : 60 µg de protéines a été placé sur gel pour les populations NIH 3T3. B : 60 µg de protéines a été placé sur gel chez les populations HFL-1. Des populations SKOV-3 CTD2 ont été utilisées à titre de contrôles positifs (illustration A couloir 6 et illustration B couloirs 3 et 4).

30. Expériences de transformation

Les populations CTD2 des NIH 3T3 et des HFL-1 ont été étroitement suivies afin de vérifier l'apparition de phénotypes qui pouvaient indiquer une transformation. La morphologie et la croissance des cellules qui composaient les différentes populations ont été régulièrement observées au microscope. Aucune différence morphologique qui pouvait indiquer une transformation n'a été remarquée. De plus, aucune différence dans la vitesse de prolifération des populations CTD2 n'a été observée par rapport à leurs contrôles. Puisque les HFL-1 n'étaient pas des cellules immortalisées, cette lignée a été gardée en culture jusqu'à leur entrée en sénescence. La période d'entrée en sénescence des HFL-1 s'est produite relativement au même moment pour toutes les populations de cette lignée. Ainsi, au 13^{ième} passage des cellules, les différentes populations HFL-1 prenaient plus de 1,5 mois à atteindre 90% de confluence ou n'arrivaient plus à atteindre la confluence.

30.1. Formation de foyers post confluence

Une expérience typiquement utilisée afin de vérifier la transformation de cellules consiste à laisser celles-ci croître à confluence et à voir si elles sont en mesure de former des foyers de croissance. Puisque les cellules HFL-1 n'étaient pas des cellules immortalisées, cette expérience a été effectuée sur les NIH 3T3. Aucune différence d'inhibition de contact n'a été observée entre les différentes populations.

Ainsi, la présence de la construction CTD2 ne semble pas avoir influencée les résultats obtenus. Les cellules de toutes les populations NIH 3T3 étaient en mesure de s'entasser fortement. Après quelques jours de croissance à confluence, la monocouche de cellule avait tendance à se détacher de la matrice de plastique des plaques 6 puits et à former des plies qui ressemblaient parfois à des foyers de croissance post confluence. Cependant, aucun foyer post confluence n'a été observé chez les différentes populations NIH 3T3.

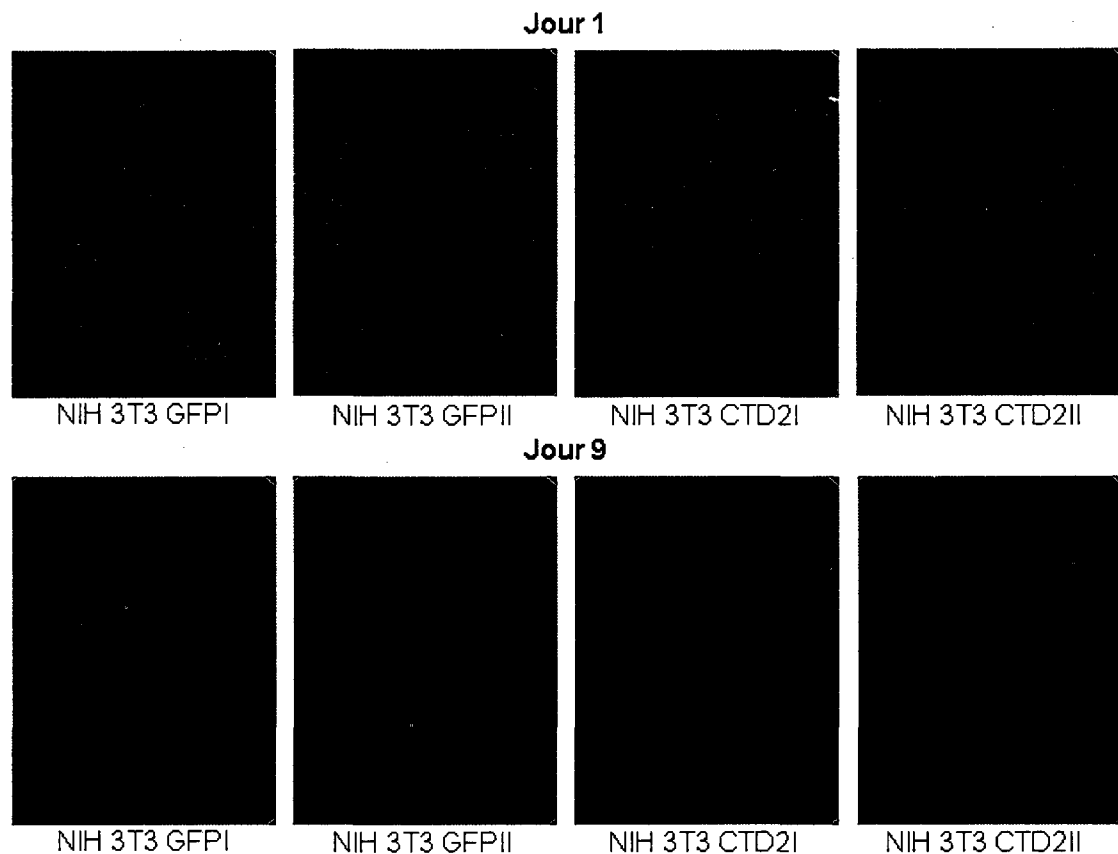


Figure 31 : Expérience de foyers post confluence chez les NIH 3T3

Les cellules ont été incubées dans des plaques 6 puits dans leurs conditions habituelles de culture soit 37°C et 5% de CO₂. Les photos des différentes populations ont été prises à 100X. La population photographiée est indiquée au bas de chacune des photos.

31. Infection de cellules OVN non-transformées non-immortalisées et validation

Suite aux expériences effectuées sur les lignées HFL-1 et NIH 3T3, il a été décidé d'infecter des OSE afin de voir si un effet du CTD serait observable chez ces cellules. En effet, ces cellules sont généralement considérées comme le point de d'origine des cancers de l'ovaire. Les cellules OVN321T, OVN225T et OVN221T (des OSE) ont été infectées avec les deux lentivirus contrôles et le lentivirus CTD2. L'efficacité de l'infection a été déterminée à partir de l'expression de la GFP chez les populations contrôles GFP, figure 32. Les résultats obtenus indiquent que l'efficacité d'infection était de près de 99% chez toutes les lignées OVN. L'intensité de la fluorescence associée à la GFP était forte chez la majorité des cellules chez les OVN221T et chez les OVN225T. Une expression de la GFP qui allait de moyenne à forte a été observée chez les cellules des OVN321T.



Figure 32 : Efficacité d'infection des OVN321T, OVN225T et des OVN221T

Les photos ont été prises avec un microscope à fluorescence à partir d'un objectif de 40X trois jours après leur infection. **A** : Population OVN221T GFPI à passage 1. **B** : Population OVN225T GFPIII à passage 1. **C** : Population OVN321T GFPIII à passage 1.

Une fois les populations établies, la morphologie des populations contrôles et des populations CTD2 a été comparée. Toutes les OSE utilisées avaient déjà acquis une morphologie mésenchymateuse au moment de l'infection. Aucune différence de morphologie n'a été observée entre les différentes populations OVN321T (Figure 33). Chez les cellules OVN221T, les populations CTD2 ont adoptées une morphologie légèrement plus fibroblastique. Ce léger changement de morphologie avait également été observé chez les populations HFL-1 CTD2 qui ont été présentées un peu plus tôt. Les cellules OVN225T étaient composées de cellules plus petites que celles retrouvées chez les autres cellules OVN utilisées. Les populations CTD2 des OVN225T ont également adoptées une morphologie plus allongée par rapport à leurs populations contrôles parentale, GFP et Cyto6.

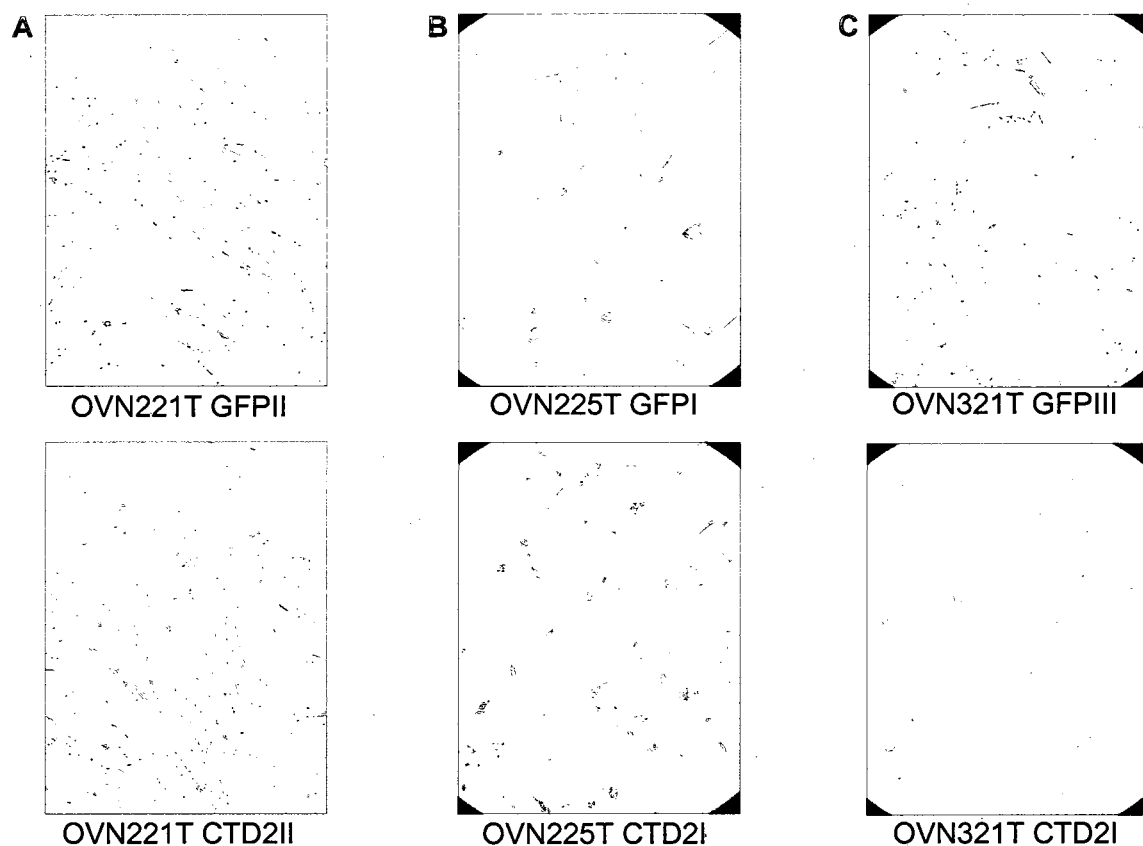


Figure 33 : Morphologie des populations OVN221T, OVN225T et OVN321T

Morphologie observée avec un objectif de 10X des différentes populations quelques jours après leur infection. L'identité des populations photographiées est indiquée au bas de chaque photo. A : OVN221T GFPII à passage 7 et OVN221T CTD2II à passage 6. B : OVN225T GFPI et OVN225T CTD2I à passage 5. C : OVN321T GFPIII et OVN321T CTD2I à passage 5.

L'expression de la construction CTD2 a ensuite été validée chez les populations de la lignée OVN221T. L'expression de la construction CTD2 a d'abord été vérifiée par RT PCR. Aucune expérience de validation n'a pu être effectuée chez les cellules OVN225T et OVN321T à cause de leur entrée rapide en sénescence. La validation des populations OVN221T par RT PCR indique que les trois populations CTD2 expriment le mARN de la construction (figure 34). Aucune bande n'a été amplifiée chez les différentes populations contrôles.

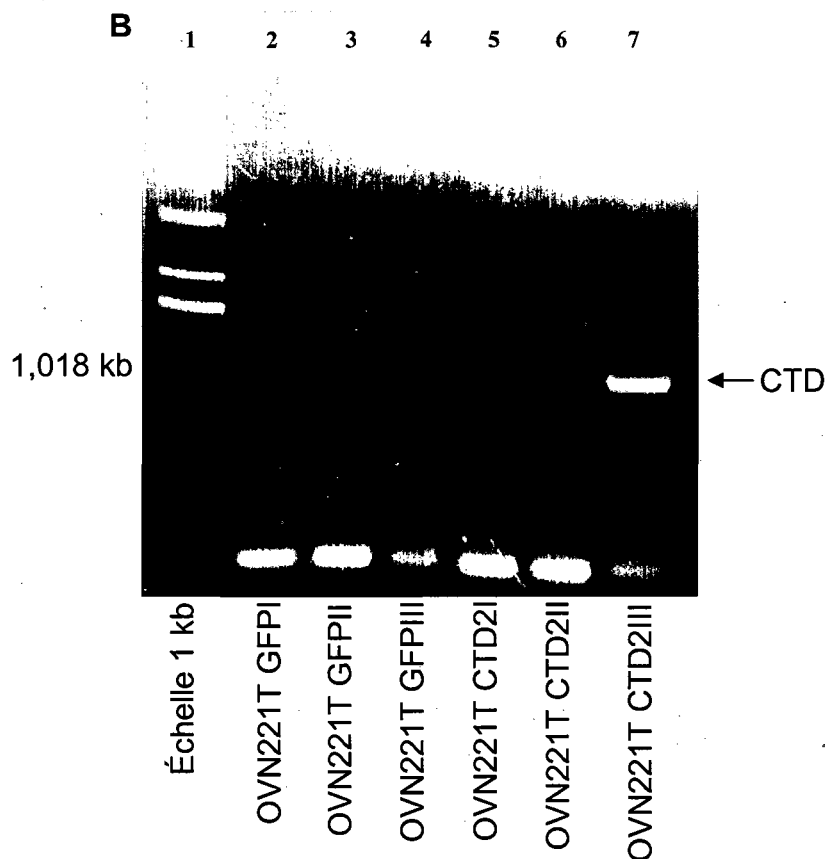


Figure 34 : Validation des populations OVN221T CTD2 par RT PCR

Les produits de PCR des populations indiquées au bas de l'illustration ont été observés sur un gel 0,7% d'agarose / TAE. 1 μ L des produits de PCR ont été placés sur le gel. L'expression de l'ARN de la construction CTD a été validée chez les trois populations OVN221T CTD2 (couloirs 5, 6 et 7).

Après avoir validé l'expression de la construction CTD2 au niveau de la transcription, la traduction en protéine a été vérifiée. L'expression de la protéine dérivée de la construction a été validée par Western. Lors de la validation finale par Western, il a été décidé de n'utiliser qu'une faible quantité de protéine à cause de la présence de fortes bandes de poids moléculaires variables chez les trois populations CTD2. Des bandes semblables avaient préalablement été observées chez les populations HFL-1 CTD2. Ainsi, 5 μ g de protéine a été placée sur gel afin de

diminuer l'intensité des bandes présentes chez les populations CTD2 et de mieux confirmer la présence de la bande typiquement associée à la construction à 55 kDa. Les populations contrôles Cyto6 ont également été placées sur le gel à titre de contrôle supplémentaire (figure 35). Comme c'était le cas avec les populations HFL-1, aucune bande non spécifique n'a été observée chez la population contrôle parentale, GFP ou Cyto6.

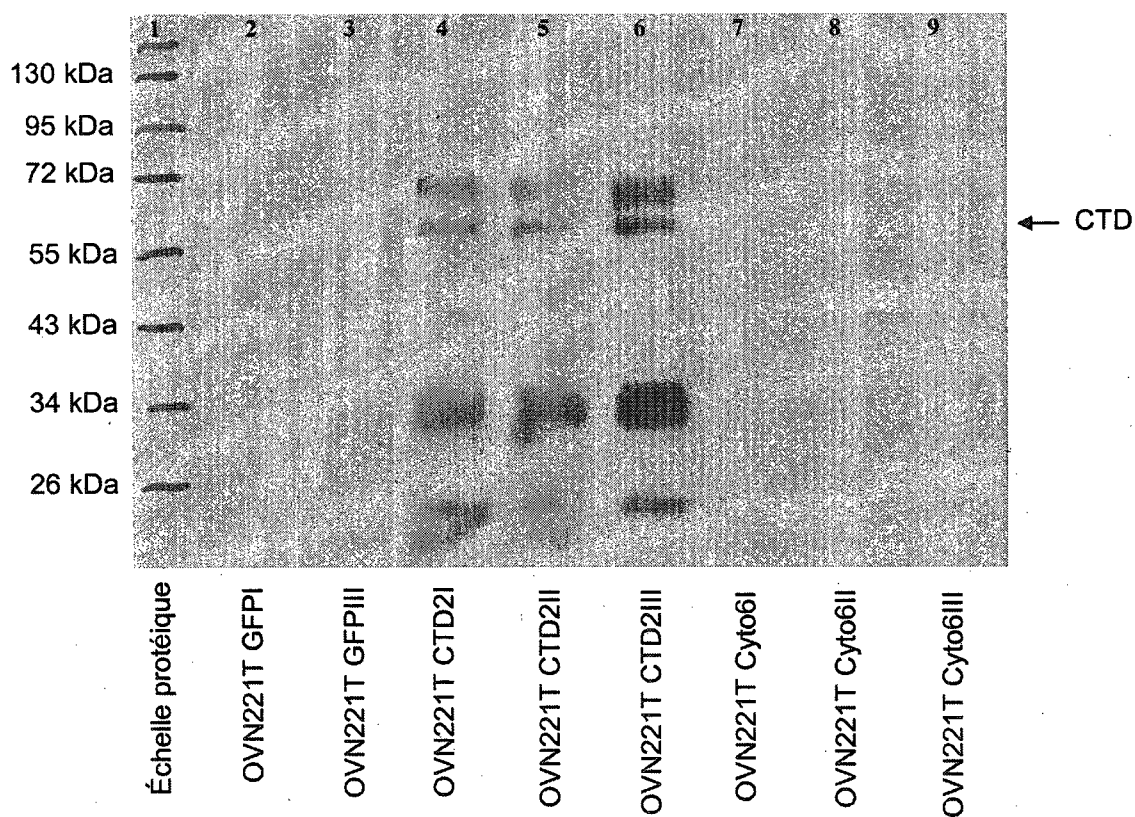


Figure 35 : Western pour la validation des populations OVN221T CTD2

Cinq microgrammes d'extraits protéiques des différentes populations indiquées au bas de chaque couloir ont été placés sur un gel 7,5 % d'acrylamide. L'expression de la protéine CTD a été validée chez les trois populations OVN221T CTD2 (couloirs 4, 5 et 6).

32. Évaluation de la transformation des cellules

La morphologie et la croissance des cellules ont été suivies attentivement après l'infection des cellules avec les différents lentivirus. Quelques différences de morphologie ont été observées chez les populations OVN221T CTD2 et OVN225T CTD2. Au niveau de la vitesse de croissance des cellules, aucune différence n'a été observée entre les différentes populations des trois cultures de OSE étudiées. L'inhibition de contact des cellules n'a pas semblé affectée par la présence de la construction CTD2. Aucune des cellules OVN n'a été immortalisée par la présence du CTD de CA125. Ainsi, les populations OVN225T sont entrées en sénescence environ une semaine après leur infection. Les populations OVN321T sont entrées en sénescence peu après leur premier passage cellulaire. Les populations OVN221T, quant à elles, sont entrées en sénescence autour des passages 16 et 17. Aucun indice qui pourrait laisser croire une transformation n'a été observé chez les différentes populations CTD2.

33. Infection des lignées immortalisées OVN95T hTERT et OVN211T hTERT et validation

Suite aux résultats obtenus, il a été décidé d'étudier l'effet du CTD de CA125 sur des OVN immortalisées avec la télomérase. Ainsi, les lignées OVN211T hTERT et OVN95T hTERT ont été infectées avec les différents lentivirus. Comme c'était le cas lors des expériences précédentes, l'efficacité d'infection a été évaluée à travers

l'observation de la fluorescence des populations GFP. Selon les résultats obtenus, l'efficacité d'infection semble avoir été près de 99% chez les lignées OVN95T hTERT et OVN211T hTERT (figure 36).

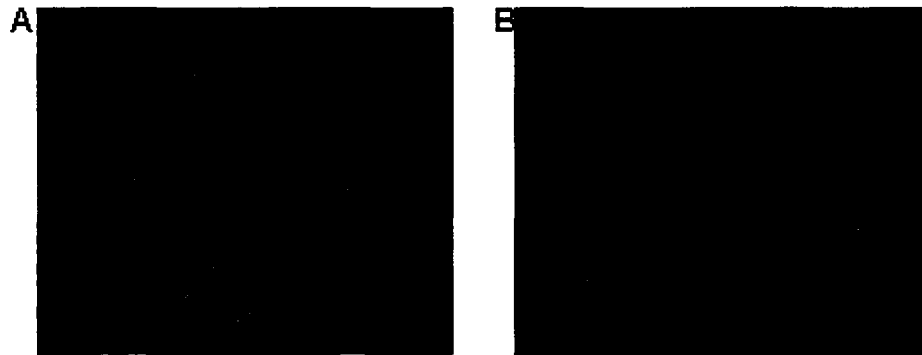


Figure 36 : Efficacité d'infection des OVN95T hTERT et OVN211T hTERT

Les photos ont été prises trois jours après l'infection des cellules avec un objectif de 40X (A) ou de 100X (B) pour évaluer l'efficacité d'infection des OVN95T hTERT et des OVN211T hTERT. A : OVN95T hTERT GFP^{II}, B : OVN211T hTERT GFP^{III}.

Après s'être assuré que l'infection des cellules avait bien fonctionné, la morphologie et la croissance des différentes populations établies ont été analysées. Comme chez plusieurs des cultures de cellules infectées précédemment, les populations CTD2 des cellules OVN95T hTERT et OVN211T hTERT ont adoptées une morphologie plus fibroblastique que celle de leurs contrôles (figure 37). Cette différence de morphologie a été conservée tout au long des passages cellulaires effectués avec ces cellules. Aucune différence n'a été observée au niveau de la vitesse de croissance des cellules. Également, l'inhibition de contact observée chez les différentes populations lors de leur culture ne semblait pas varier d'une population cellulaire à l'autre.

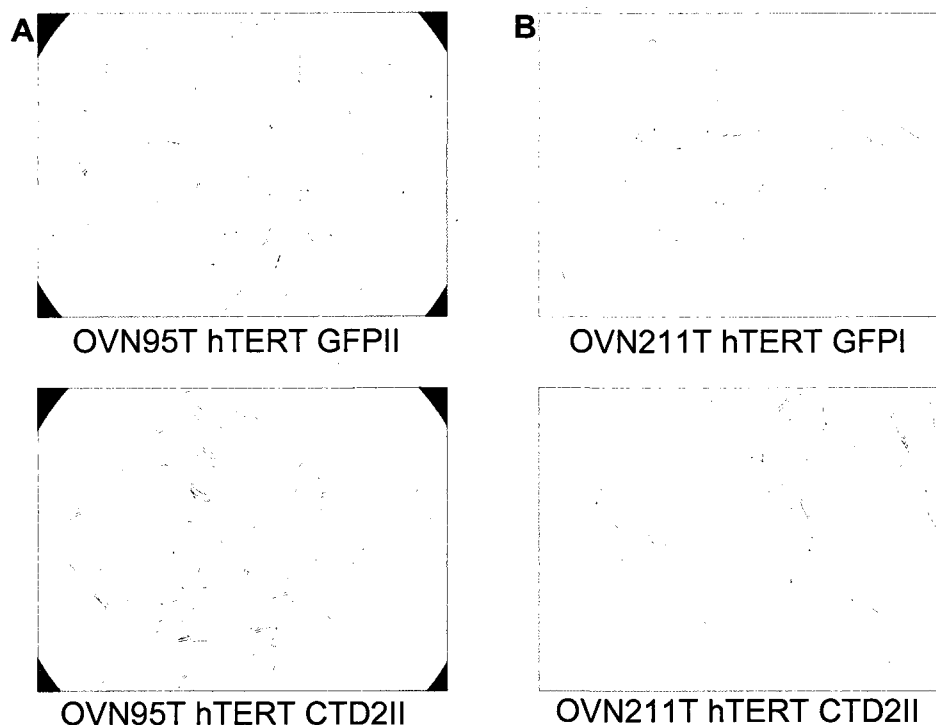


Figure 37 : Morphologie des différentes populations OV95T hTERT et OV211T hTERT
Morphologie des différentes populations indiquées au bas de chaque photo suite à leur infection. Les photos ont été prises avec un objectif de 10X. A : Populations OV95T hTERT au passage 1. B : Populations OV211T hTERT au passage 1.

Une fois les populations cellulaires sélectionnées et leur infection vérifiée par l'expression de la GFP, les cellules ont été validées à partir des expériences habituelles. Ainsi, l'expression du mARN de la construction CTD a été vérifiée par RT PCR. Les résultats indiquent que le mARN de la construction CTD est exprimée chez toutes les populations OV95T hTERT CTD (figure 38). Encore une fois, aucune bande n'a été retrouvée chez les populations contrôles.

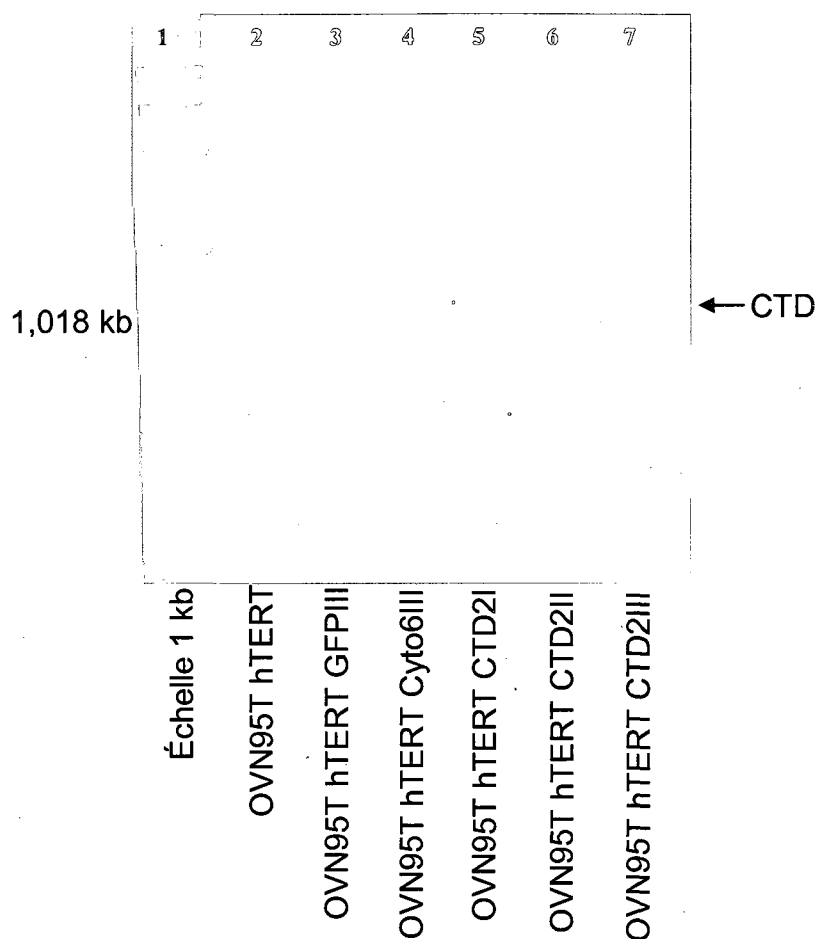


Figure 38 : Validation des populations OVN95T hTERT CTD2 par RT PCR

Un μL des produits PCR des populations indiquées au bas de l'illustration ont été placés sur un gel 0,7% agarose / TAE. La présence de l'ARN de la construction CTD a été validée chez les trois populations OVN95T hTERT CTD2 (couloirs 5, 6 et 7).

Après la validation de la transcription, l'expression protéique de la construction a été vérifiée par Western. À la lumière des résultats obtenus précédemment, une faible quantité de protéine a été placée sur gel afin de mieux visualiser les bandes qui correspondaient à la hauteur du CTD. Encore une fois, de nombreuses bandes de différents poids moléculaires étaient présentes chez les populations CTD2.

Cependant, la faible quantité de protéine placée sur gel a permis une visualisation des bandes correspondant à la taille de la construction CTD. Ainsi, selon les résultats obtenus, toutes les populations OVN95T hTERT CTD2 expriment le CTD au niveau protéique (figure 39). Encore une fois, aucune bande n'était visible chez les différentes populations contrôles.

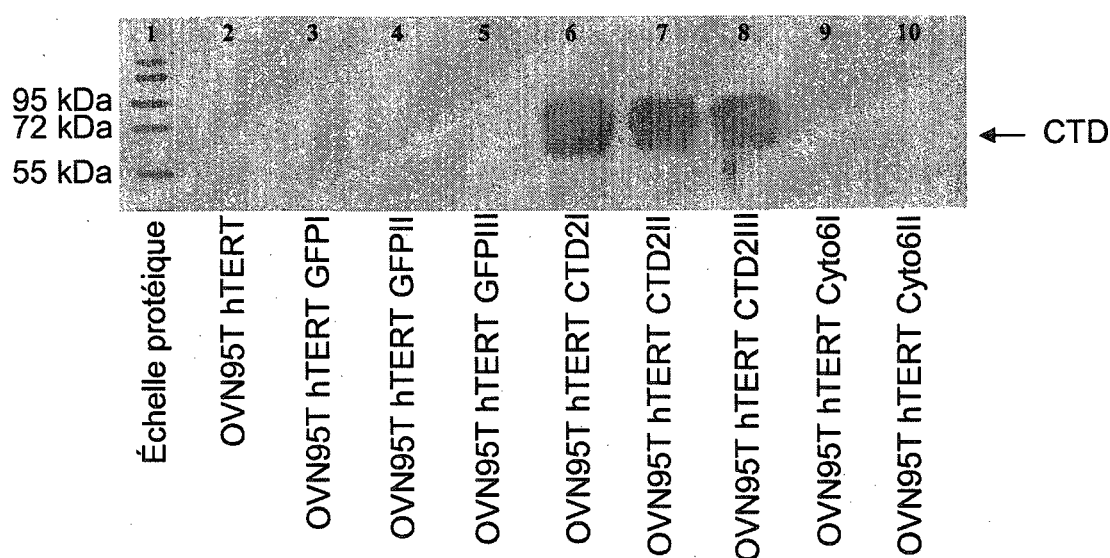


Figure 39 : Western pour la validation des populations OVN95T hTERT CTD2

Cinq microgrammes d'extraits protéiques des différentes populations OVN95T hTERT indiquées au bas du gel a été placé sur un gel 12% acrylamide. L'expression de la protéine CTD a été validée chez les populations OVN95T hTERT CTD2 (couloirs 6, 7 et 8).

Après avoir confirmé l'expression de la protéine qui découlait de la construction CTD2 la localisation de la protéine au niveau des cellules a été vérifiée. Un IF a donc été effectué chez les populations OVN95T hTERT et chez les populations OVN211T hTERT. La localisation de la construction semble en partie membranaire et cytoplasmique chez les différentes populations OVN95T hTERT

CTD2 (figure 40). L'IF a également démontré que près de 100% des cellules des populations CTD2 exprimaient le CTD. Des photos représentatives de cette forte expression ont cependant été difficiles à obtenir à cause des variations dans la force d'expression de la construction.

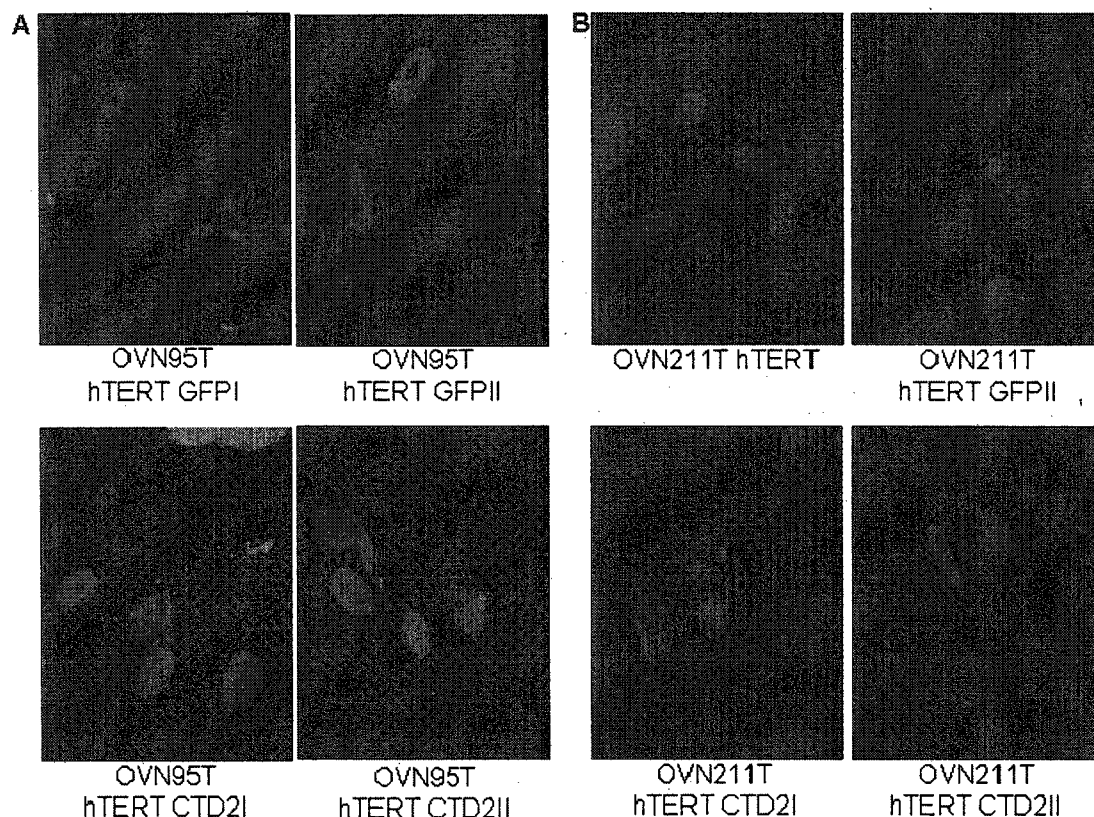


Figure 40 : Validation des populations OVN95T hTERT et OVN211T hTERT par IF

Les constructions CTD2 ont été détectées à partir de leur étiquette Myc. L'identité des différentes populations illustrées est indiquée sous chaque photo. A : Populations OVN95T hTERT à passage 3; OVN95T hTERT GFPI avec un objectif de 40X, OVN95T hTERT GFPII, CTD2I et CTD2II avec un objectif de 100X à immersion B : Populations OVN211T hTERT à passage 7 pour les GFPII, à passage 3 pour les CTD2I et à passage 4 pour les CTD2II; un objectif de 100X à immersion a été utilisé.

34. Expériences de transformations

Les premières observations effectuées sur les populations OVN95T hTERT et les populations OVN211T hTERT ne semblent pas indiquer une transformation cancéreuse des cellules. Aucun effet sur la vitesse de croissance des différentes populations n'a été observé. L'inhibition de contact observée chez les cellules en culture ne semble pas non plus varier d'une population cellulaire à une autre. Cependant, comme c'était le cas avec de nombreuses autres sortes de cellules infectées avec les différents lentivirus dans le cadre de ce mémoire, les populations CTD2 ont semblé prendre une morphologie plus fibroblastique. Des expériences supplémentaires typiquement utilisées lors d'expériences de transformations ont été effectuées afin de vérifier ces observations.

34.1. Formation de foyers post-confluence

Une expérience de formation de foyers post-confluence a été effectuée sur les différentes populations OVN95T hTERT. Aucune différence n'a pu être observée entre les différentes populations cellulaires (figure 41). Les cellules OVN95T hTERT ne semblaient pas en mesure de former des foyers de croissance post-confluence. Chez chacune des populations, quelques régions de cellules un peu plus entassées ont été observées. Ces régions sont visibles surtout au 19^{ième} jour de l'expérience.

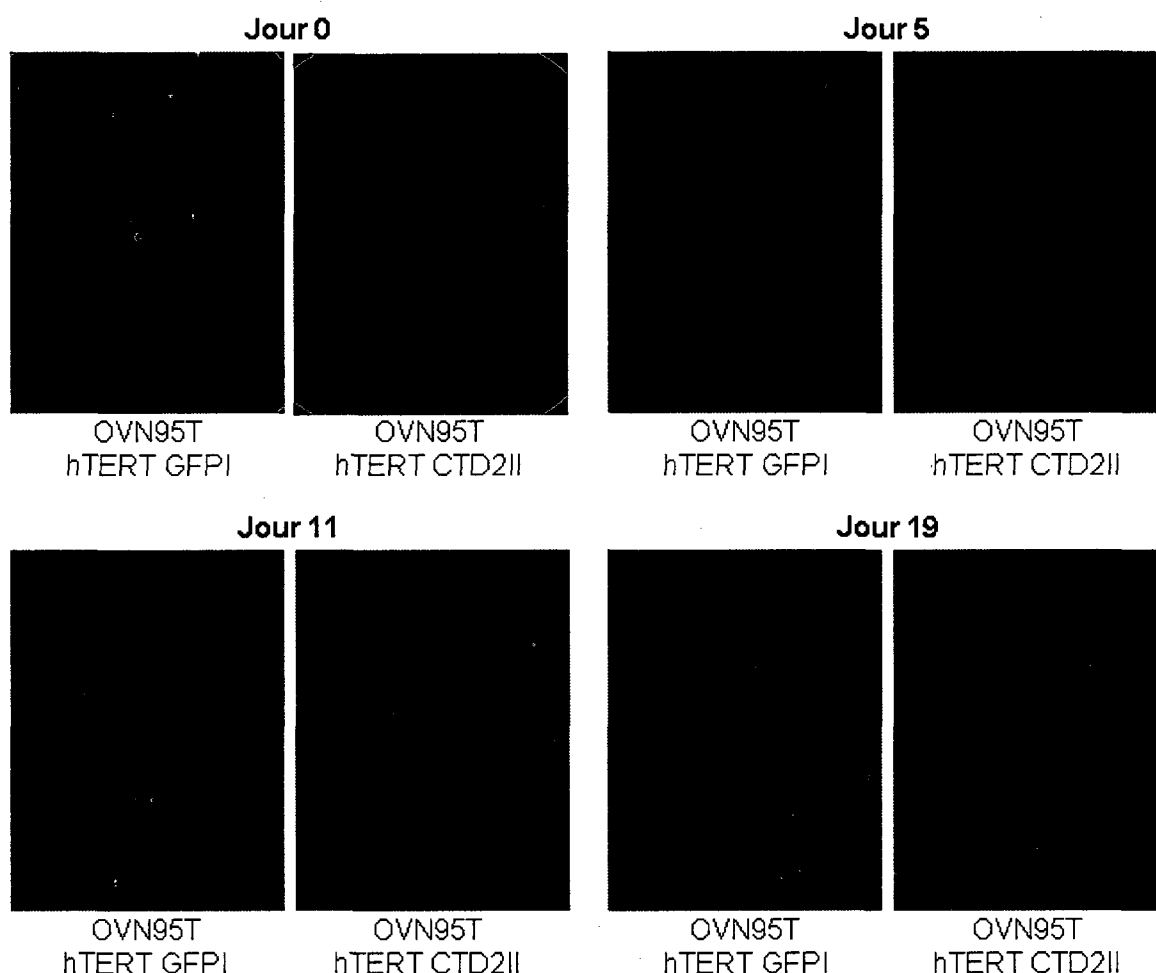


Figure 41 : Expérience de foyers post confluence chez les OVN95T hTERT

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits et incubées dans leurs conditions habituelles de culture soit 37°C et 5% de CO₂. Des photos ont été prises avec un objectif de 10X jusqu'à 19 jours après l'atteinte de la confluence.

34.2. Expérience de croissance en agar mou

Une expérience de croissance en agar mou a été effectuée avec les différentes populations OVN95T hTERT. Il s'agit d'une autre expérience typiquement utilisée pour vérifier la transformation de cellules. Les différentes populations ont été

ensemencées dans du milieu complet / 0,33% agarose afin d'évaluer leur capacité à croître en présence d'ancrage limité. Les résultats obtenus indiquent que les cellules OVN95T hTERT ne sont pas en mesure de pousser en absence d'ancrage. Chez toutes les populations OVN95T hTERT, aucune colonie n'a pu être observée (données non illustrées). Une fois l'expérience terminée, les puits d'agar ont été observés au microscope. Les cellules qui s'y trouvaient ne semblaient pas avoir proliférées. Un contrôle positif effectué avec la lignée cancéreuse de l'ovaire SKOV-3 a démontré que la croissance des cellules dans le milieu d'agar préparé pour les OVN95T hTERT était possible (données non illustrées). En effet, les cellules SKOV-3 ont réussi à former au dessus de 100 colonies lorsqu'elles ont été exposées aux mêmes conditions expérimentales que les populations OVN95T hTERT.

35. Évaluation de différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité

Suite aux expériences de transformations, il a été décidé de vérifier les effets du CTD de CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité. En effet, une protéine peut avoir un effet sur différents aspects de la tumorigénicité sans être en mesure de transformer des cellules.

35.1. Formation de sphéroïdes

Des cellules cancéreuses de l'ovaire sous forme de sphéroïdes sont souvent retrouvées au niveau de l'ascite retiré aux patientes atteintes d'un cancer le l'ovaire. Ainsi, la capacité des populations OVN95T hTERT à former des sphéroïdes a été analysée. Les résultats obtenus ont démontrés que toutes les populations OVN95T hTERT étaient en mesure de former des sphéroïdes (figure 42). Les sphéroïdes formés par toutes les populations semblaient avoir une densité et une taille similaire. De plus, chez toutes les populations OVN95T hTERT, 24 heures était suffisant à la formation des sphéroïdes. La viabilité des cellules présentes dans les sphéroïdes a été évaluée au bleu de trypan 144 heures après le début de l'expérience. Aucune différence de viabilité des cellules n'a été observée au niveau des sphéroïdes former par les différentes populations (figure 43). Aucune augmentation de la taille des sphéroïdes formés par les différentes populations n'a été observée. Finalement, les sphéroïdes formés par les différentes populations ne semblaient pas dotés d'une forte intégrité puisqu'une légère agitation suffisait à les défaire.

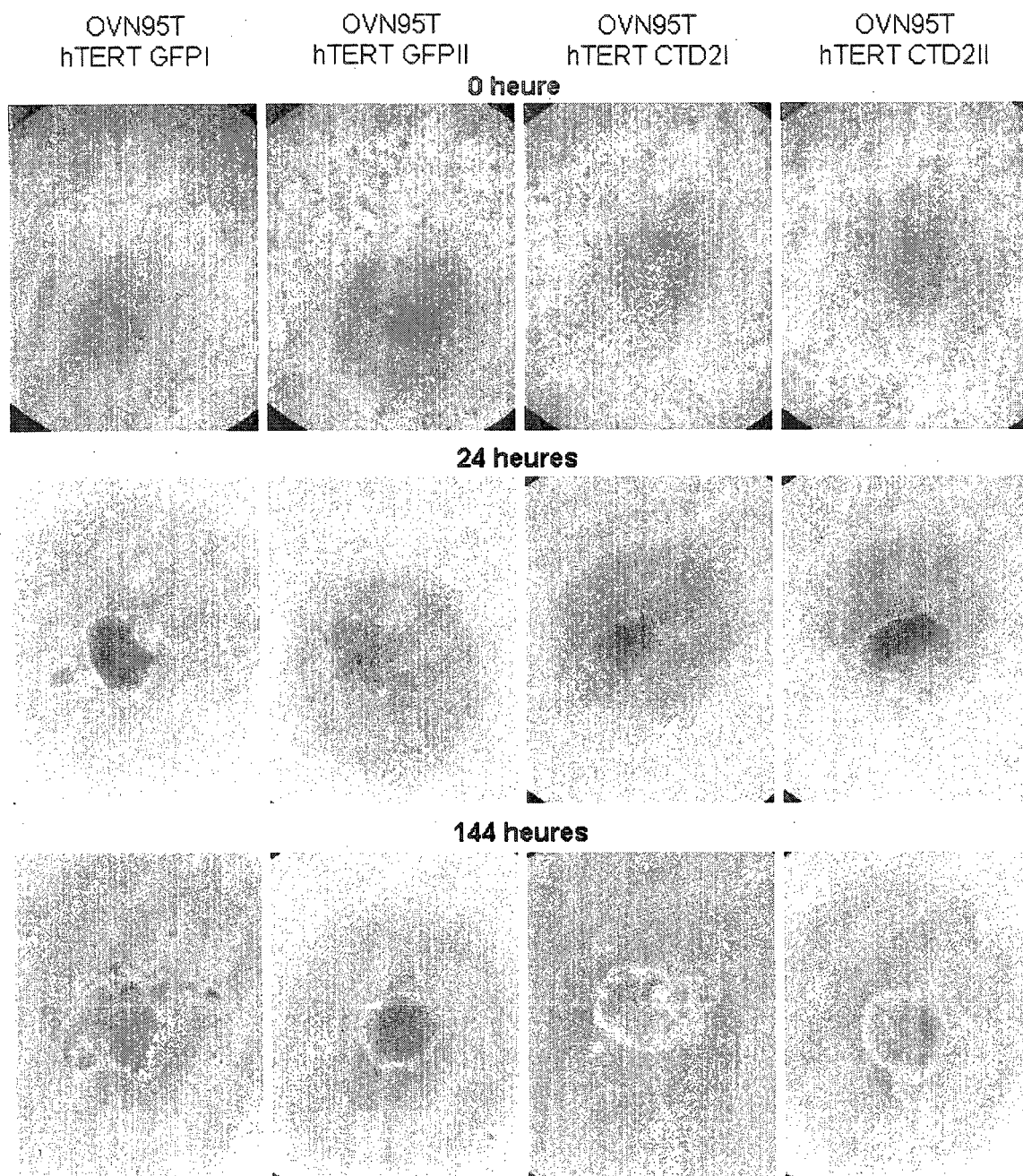


Figure 42 : Formation de sphéroïdes

L'identité des populations de cellules qui correspond à chaque colonne de photo est indiquée en haut des colonnes. Les photos ont été prises avec un objectif de 10X. Cinq gouttes de cellules en suspension ont été suspendues dans le couvercle d'un Pétri de culture pour chaque population OVN95T hTERT. Les photos illustrées sont représentatives des résultats obtenus. N = 2.

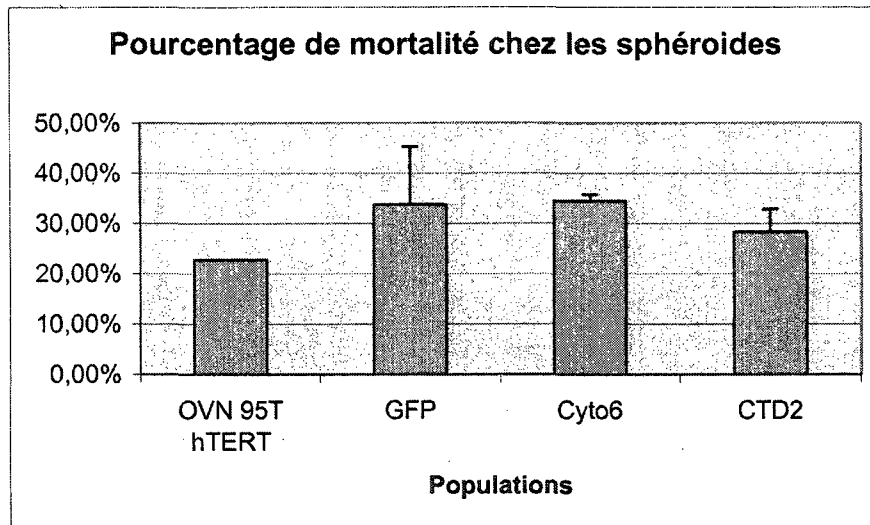


Figure 43 : Viabilité des cellules qui forment les sphéroïdes

Pourcentages de mortalité des cellules qui forment les sphéroïdes évalués avec du bleu de trypan et un hémacymètre. Les résultats obtenus pour les trois populations GFP, pour les trois populations Cyto6 et pour les trois populations CTD2 ont été combinés afin d'alléger le graphique. N = 1 (OVN95T hTERT) ou N = 3 (OVN95T hTERT GFP, Cyto6 et CTD2)

35.2. Clonogénicité sur plastique

Afin de vérifier l'habileté des cellules à pousser à faible densité et leur efficacité d'adhésion, une expérience de clonogénicité sur plastique a été effectuée sur les différentes populations. Les résultats obtenus indiquent qu'il n'existe aucune différence significative entre la clonogénicité sur plastique des différentes populations (figure 44). Les caractéristiques des colonies formées ont également été analysées. Chez toutes les populations, la taille des colonies formées était à peu près la même. Le nombre de cellules présentes dans chacune des colonies était également similaire. Finalement, l'apparence des colonies et des cellules qui composaient celles-ci ne semblait pas varier d'une population à l'autre.

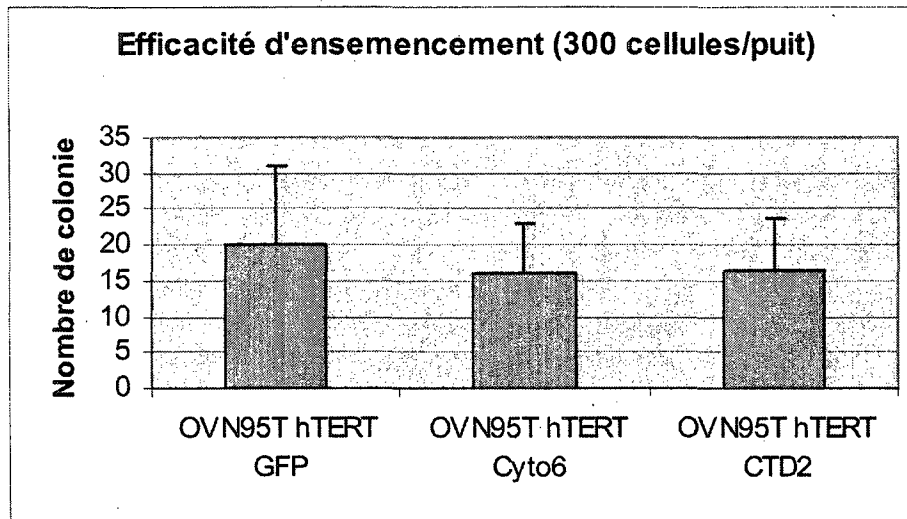


Figure 44 : Efficacité d'ensemencement des populations OVN95T hTERT

Les données du graphique proviennent d'un ensemencement de 300 cellules par puit. Les cellules ont été incubées pendant 14 jours selon leurs conditions habituelles de culture soit 37°C et 5% de CO₂. Les données des trois populations GFP, des trois populations Cyto6 et des trois populations CTD2 ont été combinées afin d'alléger le graphique. N = 6.

35.3. Expérience de migration par blessure de la monocouche

Afin de vérifier si le changement de morphologie observé chez les populations OVN95T hTERT CTD2 pourrait indiquer une augmentation de la capacité de migration des cellules, une expérience de migration par blessure de monocouche a été effectuée. La migration des cellules a été suivie pendant 48 heures au niveau de la croix tracée dans la monocouche cellulaire. Aucune différence dans la capacité de migration des différentes populations n'a été observée (figure 45).

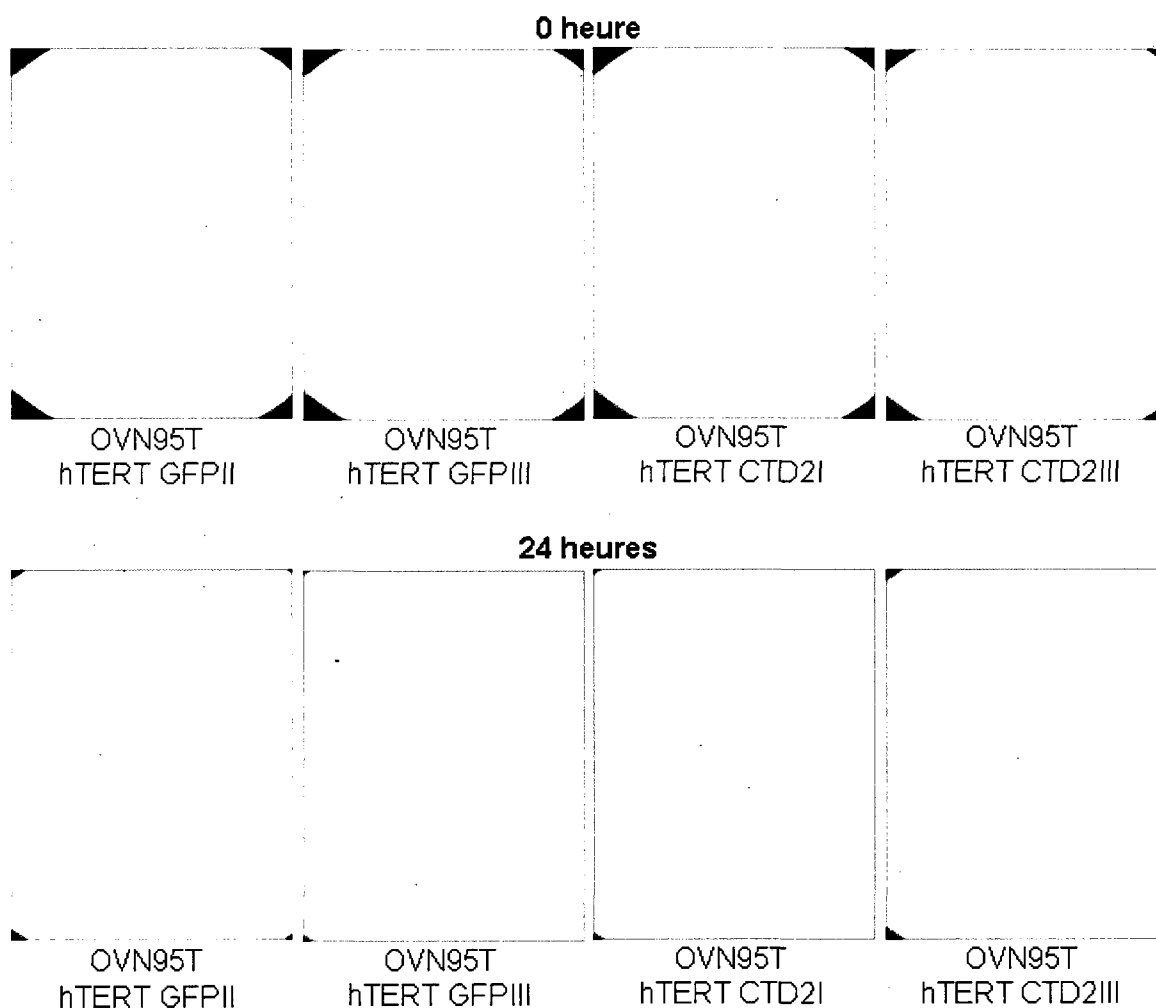


Figure 45 : Expérience de migration par blessure de la monocouche

Les cellules ont été incubées selon leurs conditions habituelles de culture mais en présence de l'inhibiteur de croissance hydroxie urée. Les cellules ont été photographiées à l'aide de l'objectif de 10X du microscope. Les photos ont été prises immédiatement après la blessure de la monocouche et 24h après celle-ci.

36. Sensibilité au cisplatine

En fonction des résultats préalablement obtenus dans le laboratoire qui semblaient associer l'expression de la portion CTD de CA125 à une augmentation de la résistance des cellules à différents agents chimiothérapeutiques affectant l'ADN, la

sensibilité au cisplatine des différentes populations OVN95T hTERT a été évaluée. La mortalité cellulaire associée à l'exposition au cisplatine a régulièrement été observée au microscope. Différentes concentrations de cisplatine ont été utilisées. Aucune différence de sensibilité au cisplatine n'a été observée entre les différentes populations et ce, malgré les nombreuses conditions expérimentales essayées (figure 46). Il a été remarqué que les populations contrôles exposées au cisplatine finissaient par adopter une morphologie analogue à celle associée aux populations CTD2.

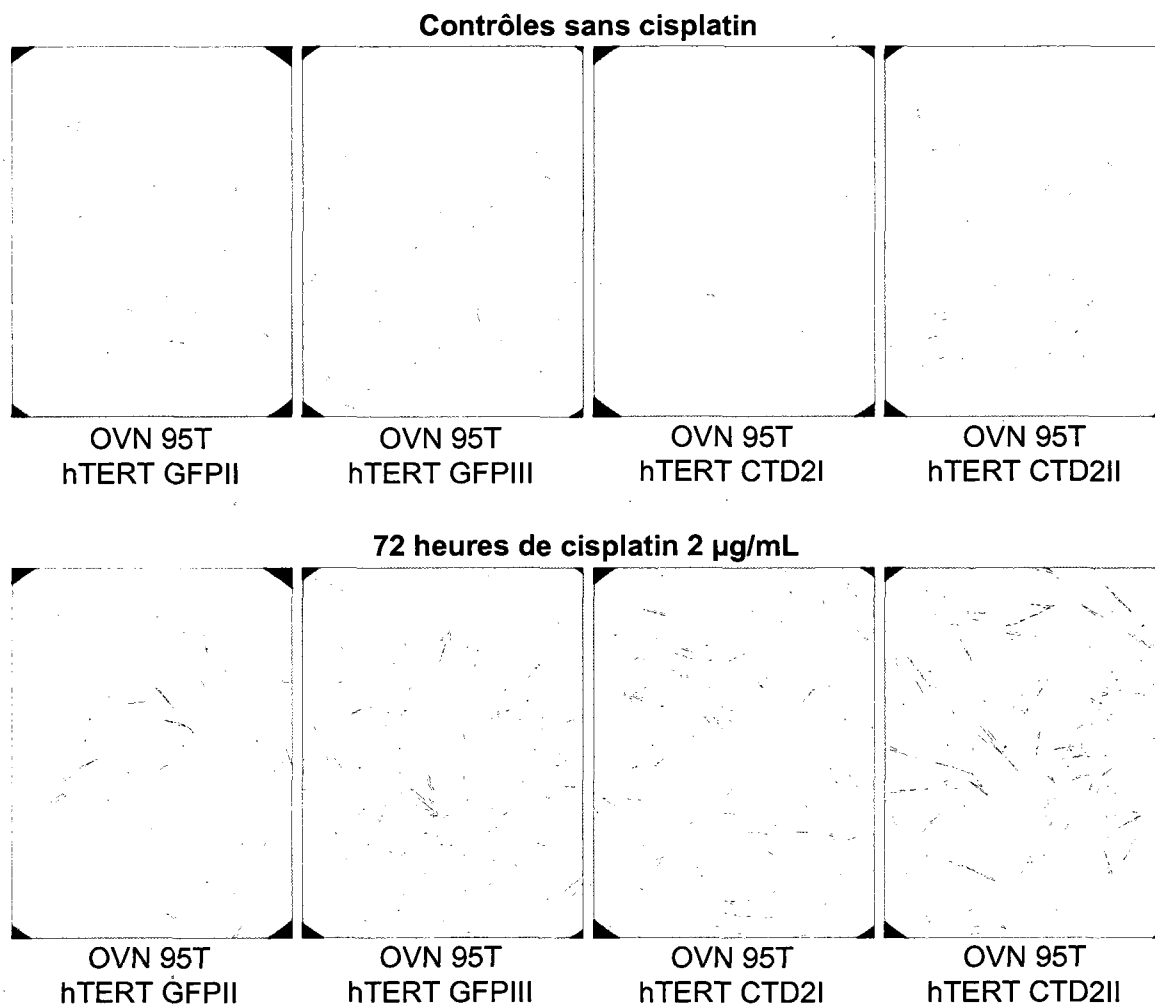


Figure 46 : Sensibilité des populations OVN95T hTERT au cisplatine

Des photos des différentes populations exposées à 2 $\mu\text{g/mL}$ de cisplatine pour une période de 72 heures ont été prises. Les cellules illustrées sur chaque photo sont identifiées au bas des photos. L'objectif de 10X du microscope a été utilisé.

37. Microscopie électronique sur les OVN95T hTERT

Les jonctions cellulaires varient grandement d'un type cellulaire à un autre. De plus, lorsqu'il y a transformation cellulaire, on observe souvent des modifications

au niveau des jonctions cellulaires. Les jonctions cellulaires des différentes populations ont été observées par microscopie électronique. Les grossissements utilisés pour la visualisation des cellules variaient entre 60 000X et 80 000X. Aucune différence n'a pu être observée entre les différentes populations OVN95T hTERT (figure 47). Aucune différence dans la fréquence des jonctions retrouvées chez les différentes populations n'a été observée. Également, aucune différence dans le type de jonction cellulaire retrouvée n'a été remarquée lors de l'analyse. Des jonctions serrées ont été observées niveau des membranes apicales de cellules adjacentes. Ces jonctions sont caractérisées par un rapprochement répété de la membrane plasmique apicale des cellules. Des desmosomes, un type de jonction d'ancrage formé par des cadhérines qui consiste en d'importantes plaques d'adhésion où s'ancrent des filaments intermédiaires, ont également été observés. Quelques jonctions adhérentes ont également été observées chez les différentes populations OVN95T hTERT. Ces jonctions également formées par des cadhérines sont un peu plus pâles que les desmosomes lorsque observées par microscopie électronique. Les jonctions adhérentes sont des plaques d'adhésion où s'ancrent des filaments d'actine. Finalement, quelques jonctions communicantes ont également été observées. Selon l'angle de vu, ces jonctions formées par des connexines peuvent être reconnues par un rapprochement des membranes cellulaires qui peuvent parfois même donner l'impression de s'être fusionnées ou par des plaques foncées en forme de nid d'abeille (figure 47) (ALBERTS *et al.*, 2008).

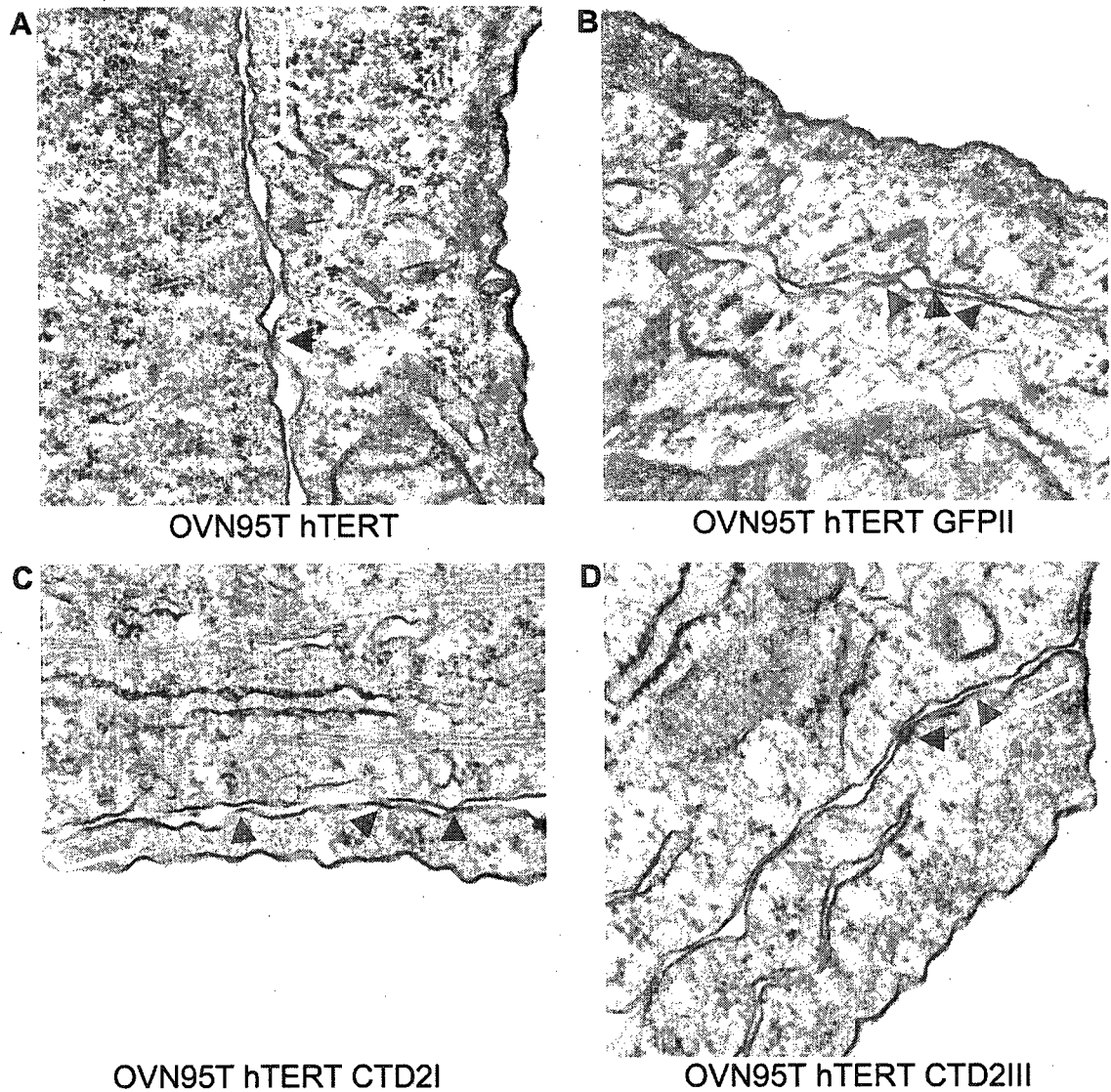


Figure 47 : Microscopie électronique

Les cellules ont été observées à des grossissements de 60 000X, 70 000X ou 80 000X. A : OVN95T hTERT à 60 000X. B : OVN95T hTERT GFPII à 70 000X. C : OVN95T hTERT CTD2I à 70 000X. D : OVN95T hTERT CTD2III à 70 000X. Parenthèses jaunes : jonctions serrées, flèches bleues : desmosomes, flèches rouges : jonction adhérentes et flèche verte : jonctions communicantes.

38. Analyse du patron d'expression de protéines d'adhésion

Pour faire suite au changement de morphologie observée chez 70% des populations CTD2 établies chez les différentes cellules étudiées, il a été décidé d'étudier le patron d'expression de différentes protéines d'adhésion ainsi que le patron d'expression de différentes protéines du cytosquelette. Des IF ont été utilisés afin de visualiser la localisation des protéines étudiées et afin de pouvoir comparer leur abondance.

38.1. IF et Western pour la N-cadhérine

Les cadhérines sont des protéines d'adhésion impliquées au niveau des jonctions cellulaires. Le patron d'expression des cadhérines est souvent affecté lorsqu'une cellule acquiert des caractéristiques cancéreuses. Lorsqu'une cellule devient cancéreuse, on observe souvent une diminution de l'expression de la E-cadhérine. Cette diminution d'expression entraîne souvent une diminution des interactions cellules-cellules et pourrait encourager la dissémination des cellules et la formation de métastases. L'expression des cadhérines chez les cellules cancéreuses de l'ovaire diffère des patrons d'expression typiquement retrouvés chez d'autres types de cancers épithéliaux. Comme mentionné dans l'introduction de ce mémoire, les OSE expriment généralement la N-cadhérine et n'expriment pas la E-cadhérine. Des observations faites par certains chercheurs indiquent que, lors de la transformation de OSE en cellules cancéreuses, l'expression de la N-cadhérine tend

à diminuer. Cette diminution est également souvent accompagnée d'une expression de la E-cadhérine (AUERSPERG *et al.*, 2001). Ainsi, des modifications au niveau des patrons d'expression des cadhérines peuvent parfois indiquer une progression des cellules vers un état métaplasique.

Un IF et un Western ont été effectué afin d'évaluer le patron d'expression de la N-cadhérine et la concentration de cette protéine chez les différentes populations OVN95T hTERT. Selon les résultats obtenus, la N-cadhérine serait exprimée chez toutes les populations OVN95T hTERT. Le patron d'expression de la protéine et la localisation de celle-ci ne semble pas varier en fonction de la population cellulaire. L'IF, semble toutefois indiquer que l'intensité de marquage pour la N-cadhérine serait légèrement plus faible chez les populations OVN95T hTERT CTD2 (figure 48). Cependant, aucune différence d'expression n'est visible par Western (figure 49).

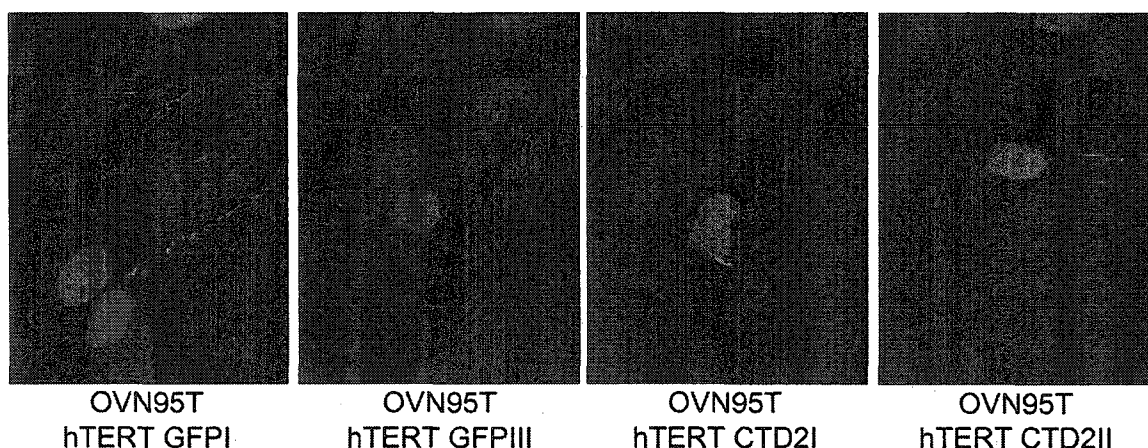


Figure 48 : IF pour la N-cadhérine chez les populations OVN95T hTERT

L'IF a été fait sur des cellules à passage 3. Les photos ont été prises à l'aide de l'objectif à immersion de 100X. L'identité des populations photographiées est indiquée au bas de celle-ci.

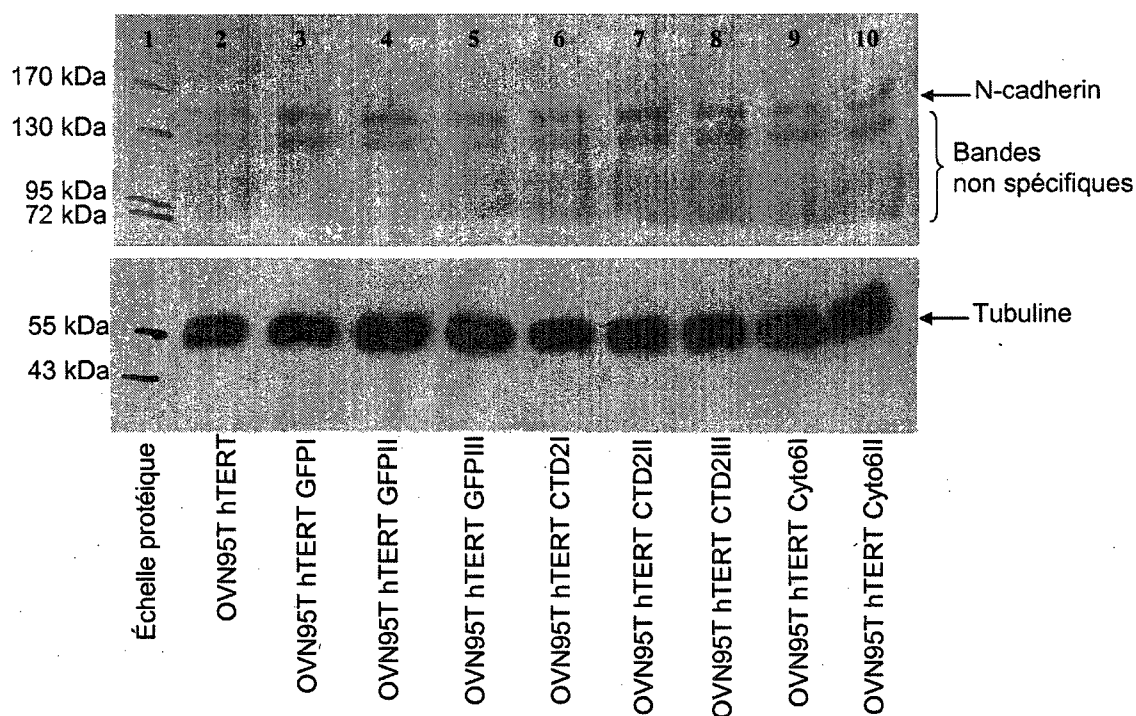


Figure 49 : Western pour la N-cadhérine chez les populations OVN95T hTERT

Cinq microgrammes d'extraits protéiques des différentes populations indiquées au bas de chaque couloir ont été mis sur un gel 7,5% d'acrylamide. La bande qui correspond à la N-cadhérine serait la bande supérieure visible sur le gel supérieur.

38.2. IF et Western pour la E-cadhérine

Afin de voir si une translocation vers une expression de la E-cadhérine était présente chez les différentes populations OVN95T hTERT, un IF et un Western ont été effectués. Aucune expression de la E-cadhérine n'a été observée chez les différentes populations OVN95T hTERT que ce soit par IF ou par Western (figure 50 et figure 51).



OVCAR-3
(Contrôle +)



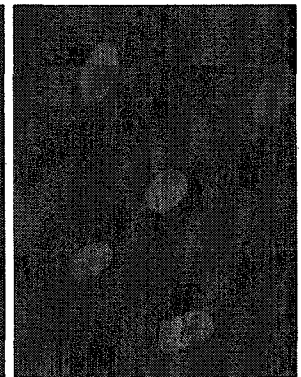
OVN95T
hTERT GFPI



OVN95T
hTERT GFPIII



OVN95T
hTERT CTD2II



OVN95T
hTERT CTD2III

Figure 50 : IF pour la E-cadhérine chez les populations OVN95T hTERT

L'IF a été fait sur des cellules à passage 3. Les photos ont été prises à l'aide de l'objectif à immersion de 100X. Les populations photographiées sont indiquées au bas de chaque photo.

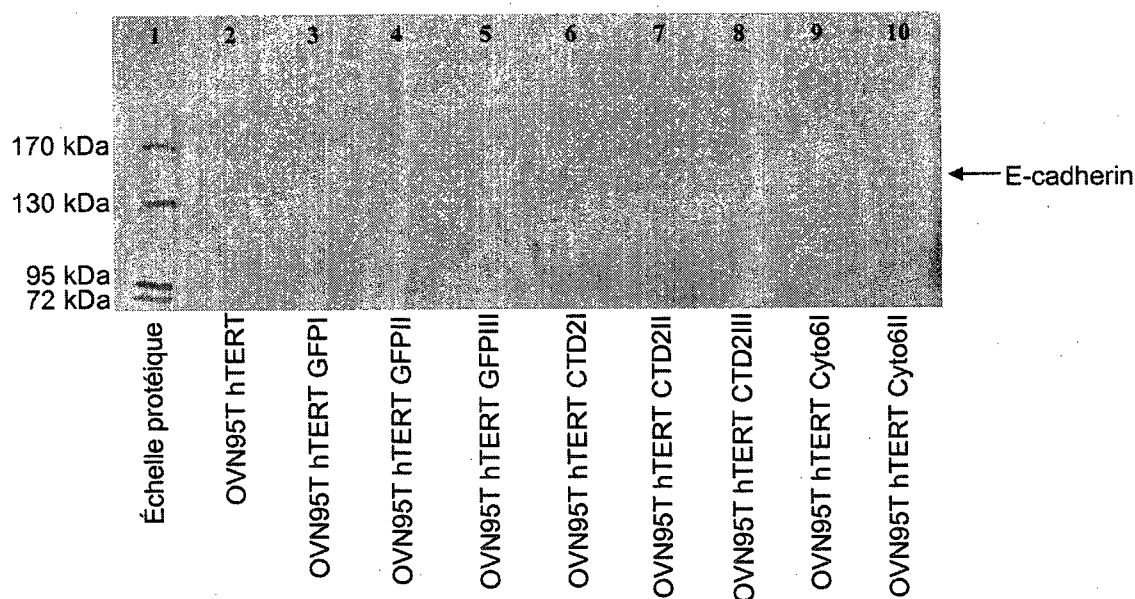


Figure 51 : Western pour la E-cadhérine chez les populations OVN95T hTERT.
Cinq microgrammes d'extraits protéiques ont été placés sur gel pour chacune des populations indiquées au bas de l'illustration. Un gel 7,5% d'acrylamide a été utilisé.

38.3. IF pour la β -caténine

La β -caténine est une protéine dotée de deux fonctions différentes. Lorsque présente à la membrane cellulaire, elle joue un rôle au niveau des jonctions adhérentes. Lorsqu'elle se retrouve au niveau cytoplasmique et nucléaire, elle joue le rôle d'un facteur de transcription de la voie de WNT/wingless. Le patron d'expression de la β -caténine peut donc indiquer les fonctions que tient la protéine chez la cellule étudiée (DIETRICH *et al.*, 2002). Le patron d'expression et la concentration de la β -caténine a été évalué chez les différentes populations OVN95T hTERT. Les résultats obtenus indiquent que les cellules OVN95T

hTERT n'expriment pas très fortement la β -caténine. Aucune différence au niveau du patron d'expression de la protéine n'a été observée entre les différentes populations OVN95T hTERT analysées. Chez toutes les lignées observées, la protéine semblait se situer au niveau de la membrane cellulaire (figure 52).

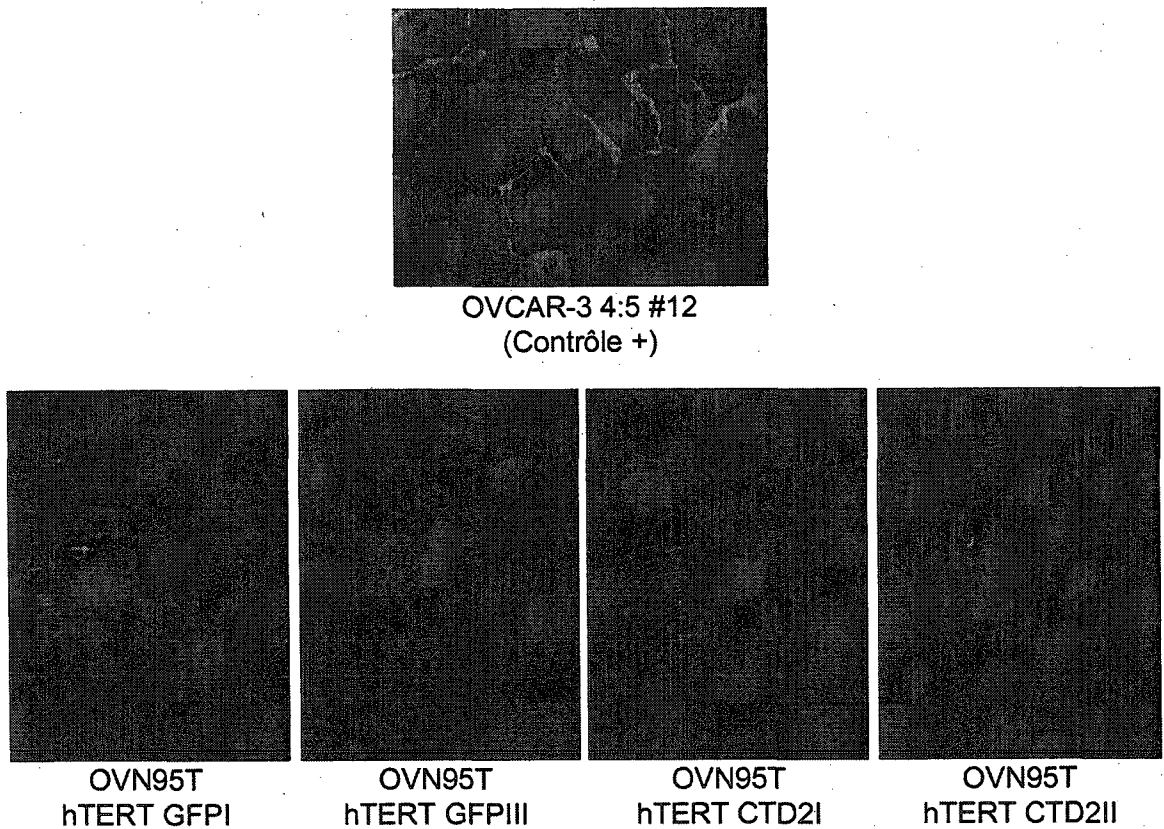


Figure 52 : IF pour la β -caténine chez les populations OVN95T hTERT

Les photos des populations indiquées au bas de chaque photo ont été prises avec un objectif à immersion de 100X. Les cellules utilisées étaient de passage 18. Le clone stable OVCAR-3 4 :5 #12, dérivé d'une lignée épithéliale cancéreuse de l'ovaire, a été utilisé en tant que contrôle positif.

39. IF sur différentes composantes du cytosquelette

39.1. IF pour les cytokératines 8 et 18

Après avoir évalué les effets du CTD de CA125 sur les jonctions cellulaires, les effets de la construction sur quelques composantes du cytosquelette ont été analysés. Chez les OSE, l'expression des cytokératines 8 et 18 permet d'évaluer le caractère épithélial ou mésenchymateux des cellules.

L'expression des cytokératines 8 et 18 a d'abord été évaluée chez les différentes populations OVN95T hTERT. L'expression de ces protéines n'était pas visible chez les différentes populations OVN95T hTERT (figure 53).

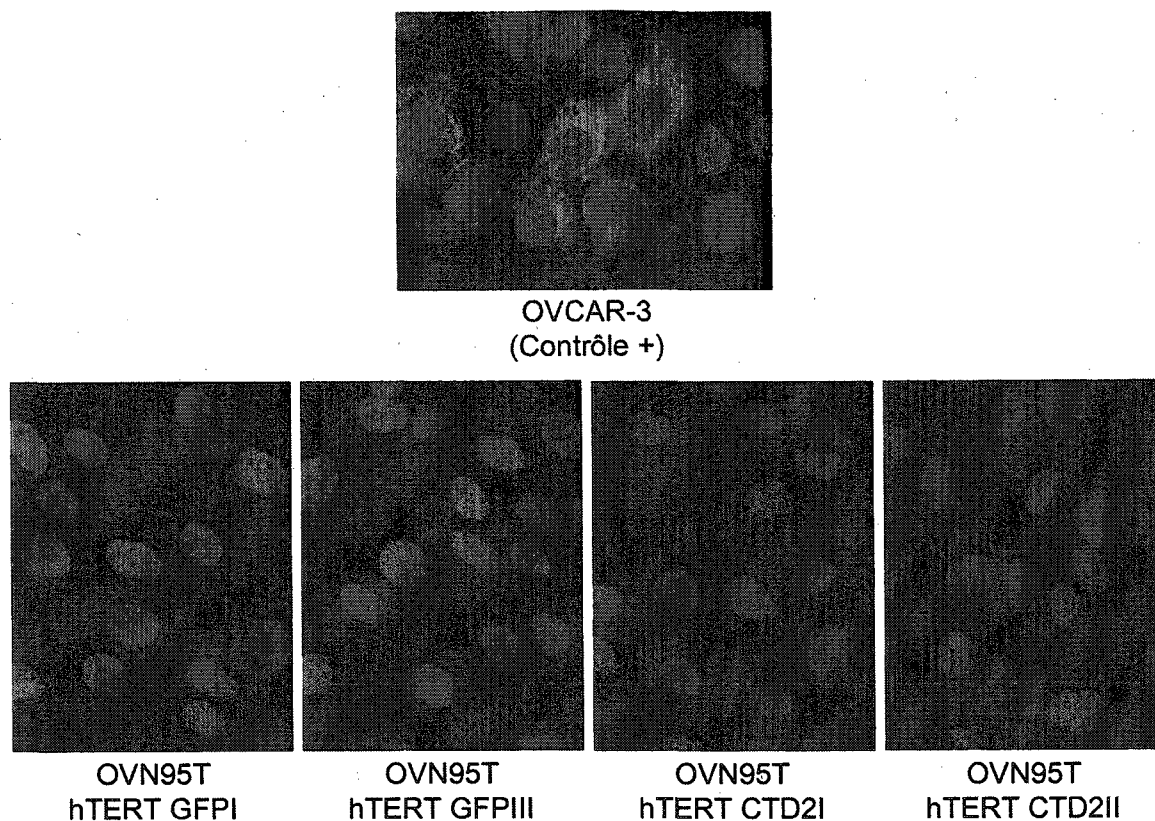


Figure 53 : IF pour les cytokératines 8 et 18 chez les populations OVN95T hTERT

Les cellules de passage 18 ont été photographiées avec un objectif à immersion de 100X. La lignée épithéliale cancéreuse de l'ovaire OVCAR-3 a été utilisée en tant que contrôle positif. Les populations photographiées sont indiquées au bas de chaque photo.

39.2. IF pour la vimentine

Le patron d'expression de la vimentine a été évalué chez les différentes populations OVN95T hTERT. La vimentine est une composante du cytosquelette généralement associée aux cellules mésenchymateuses qui influence la morphologie des cellules. Les résultats obtenus indiquent qu'il ne semble pas y avoir de différence au niveau de la concentration de vimentine exprimée d'une population de cellules à l'autre.

Cependant, le patron d'expression de la vimentine chez les populations OVN95T hTERT CTD2 semble suivre leur morphologie allongée. Ainsi, chez ces cellules, le patron d'expression de la vimentine semble caractérisé par une plus grande organisation et un patron plus en longueur comparativement aux populations contrôles (figure 54).

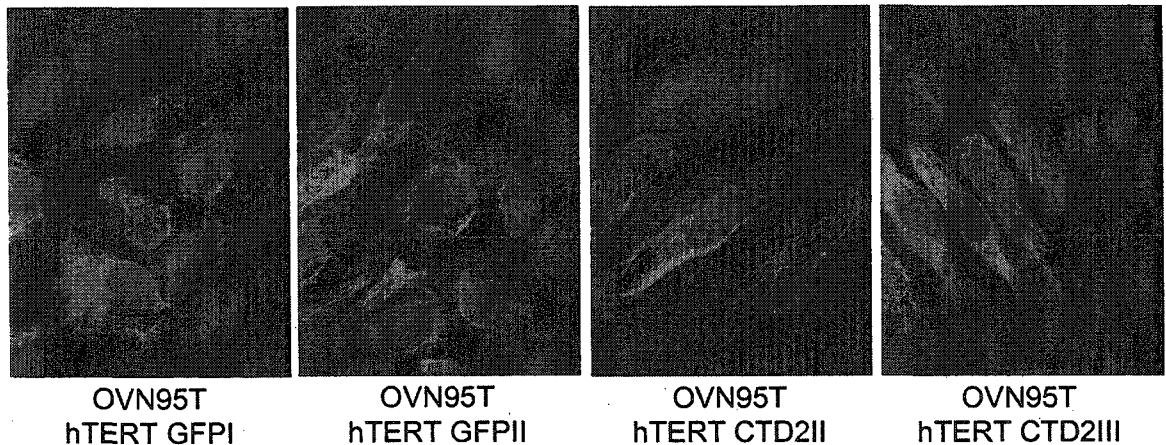


Figure 54 : IF pour la vimentine chez les populations OVN95T hTERT

Les photos ont été prises avec un objectif à immersion de 100X. Les cellules analysées étaient à passage 18. Les populations illustrées sont indiquées au bas de chaque photo.

39.3. IF pour la F-actine

La concentration et le patron d'expression de la protéine F-actine a été évalué par IF chez les différentes populations OVN95T hTERT. On observe souvent des modifications dans le patron d'expression de cette protéine lors d'une transformation cellulaire. Aucune différence de concentration de la protéine n'a été observée entre les différentes populations. Le patron d'expression de la protéine

variait peu d'une population à l'autre (figure 55). Toutefois, le patron d'expression des différentes populations OVN95T hTERT CTD2 semblait organisé un peu plus en longueur par rapport aux autres populations contrôles.

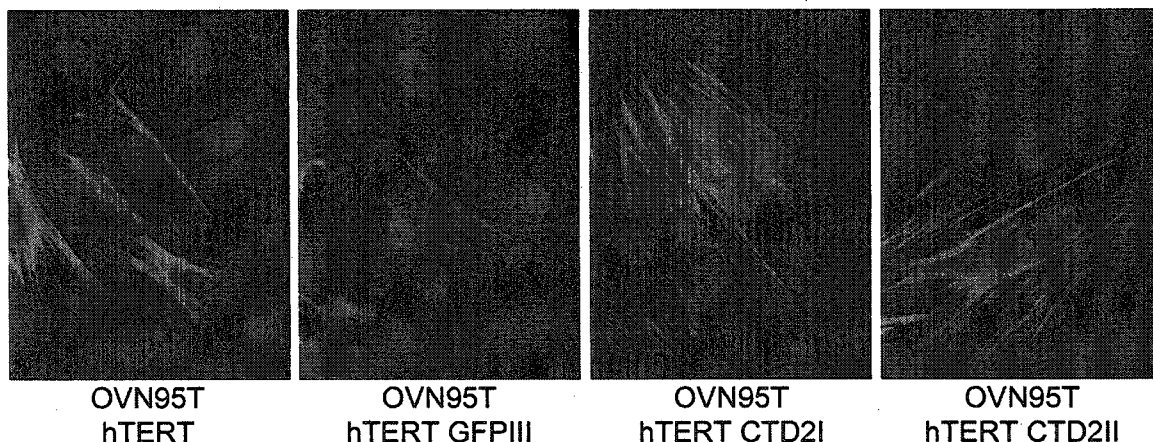


Figure 55 : IF pour la F-actin chez les populations OVN95T hTERT

Les photos ont été prises avec un objectif à immersion de 100X. Les cellules utilisées étaient de passage 32. Les populations illustrées sont indiquées au bas de chaque photo.

40. Effets du CTD sur la voie du HGF

Les effets de la présence du CTD sur la voie de signalisation HGF et de son récepteur MET ont été analysés. Ainsi, les différentes populations ont été exposées à du milieu sans sérum pour 24 heures, à du milieu sans sérum complémenté de HGF pendant 5 minutes ou à du milieu sans sérum complémenté avec du HGF pour 24 heures. Les niveaux d'expression de AKT et de MET ainsi que certaines phosphorylations de ces protéines ont ensuite été analysés. Les concentrations de MET étaient similaires chez toutes les cellules non exposées au HGF ou chez les

cellules exposées au HGF pendant 5 minutes. Après 24 heures d'exposition au HGF, la concentration du récepteur diminuait chez toutes les populations. Aucune différence n'a été observée entre les différentes populations (figure 56). La phosphorylation activatrice de la dégradation de MET, Y1003, a également été suivie lors de cette expérience. Les résultats obtenus indiquent que la phosphorylation de Y1003 n'est pas affectée par une exposition de 5 minutes de HGF. Ainsi, la concentration de phospho-MET Y1003 semble relativement stable sans HGF ou après une exposition de 5 minutes. Les niveaux de phospho-MET Y1003 chute lorsque les cellules se trouvent à être exposées à du HGF pour 24 heures. Il est cependant à noter que la concentration de phospho-MET Y1003 correspond au niveau d'expression du récepteur MET. Encore une fois, aucune différence d'expression n'a été observée entre les différentes populations OVN95T hTERT. En ce qui concerne la protéine AKT, son expression semble similaire partout. Ainsi, les niveaux d'expression de la protéine ne variaient pas en fonction des conditions imposées aux cellules ou de la population analysée. Cependant, l'expression d'AKT phosphorylé variait fortement en fonction de l'exposition au HGF. Ainsi, une forte augmentation de la phosphorylation d'AKT était observée après 5 minutes d'exposition au HGF. Toutefois, la phosphorylation d'AKT chutait plus bas que celle observée chez les cellules non exposées au HGF après 24 heures d'exposition. La quantité de protéine placée sur gel pour chaque échantillon a été comparée à partir de la GAPDH. Une même quantité de protéine a été mise sur gel pour chaque échantillon.

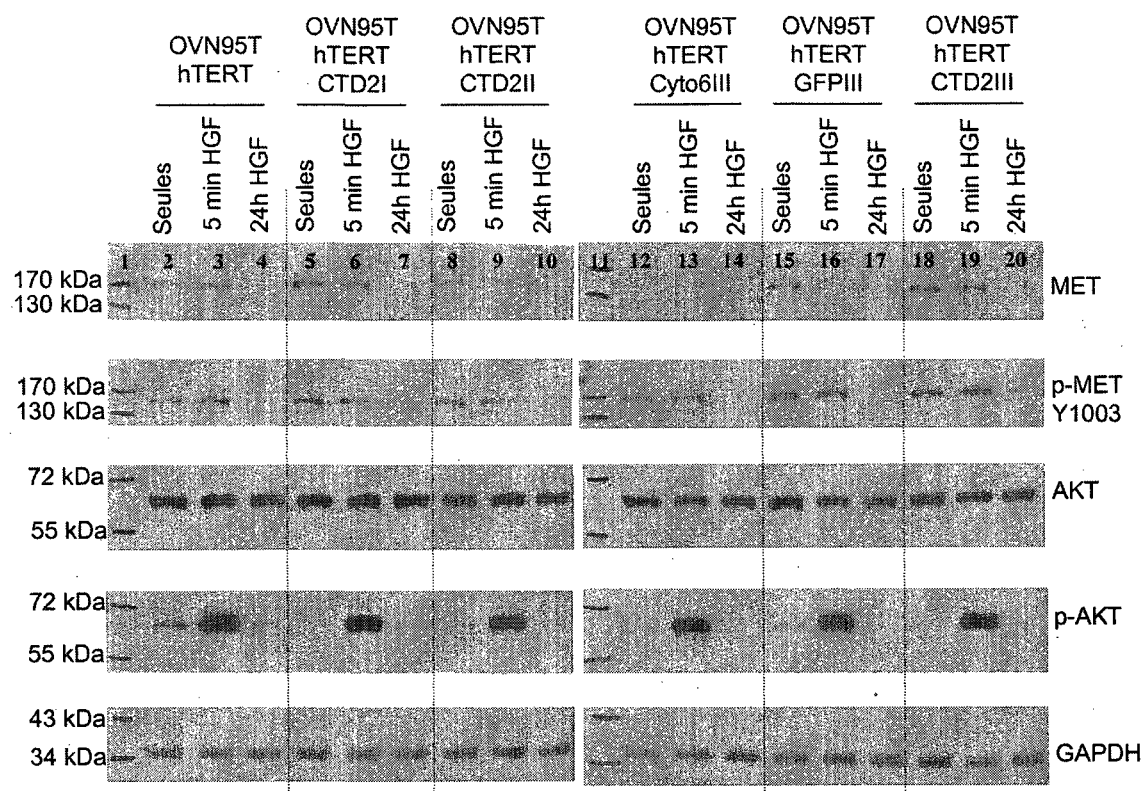


Figure 56 : Exposition des populations OVN95T hTERT au HGF

Les extraits protéiques des différentes populations OVN95T hTERT indiquées en haut des illustrations ont été placés sur un gel 12% acrylamide. Douze microgrammes de protéines ont été utilisés pour tous les échantillons. Les différentes conditions utilisées pour les différents lysats d'une même population sont indiqués au dessus de chaque couloir de migration.

Discussion

41. Rappel

Les principes généraux qui gouvernent le développement d'un cancer restent globalement les mêmes d'un type de cancer à un autre. Pour devenir cancéreuse, une cellule doit subir des mutations qui lui permettent d'acquérir plusieurs avantages. Ces caractéristiques sont : l'autosuffisance par rapport aux signaux de croissance, l'insensibilité par rapport aux signaux inhibiteurs de croissance, la résistance à l'apoptose, l'immortalisation, la capacité à stimuler l'angiogénèse et la capacité à envahir des tissus et à former des métastases (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000). De nombreuses mutations peuvent permettre à une cellule d'acquérir les avantages prolifératifs associés à l'un ou plusieurs de ces six grands axes. C'est pourquoi la transformation d'une cellule en une cellule cancéreuse peut être un processus relativement complexe.

Le cancer de l'ovaire est un cancer relativement rare. Cependant, très peu de femmes atteintes du cancer de l'ovaire guérissent complètement de la maladie (DUBOIS *et al.*, 2003). Les ovaires sont recouverts d'une monocouche de OSE. Ces cellules qui ont longtemps été ignorées par la communauté scientifique seraient l'origine de 90% des cancers de l'ovaire (ALETTI *et al.*, 2007; COLOMBO *et al.*, 2006). On observe chez les OSE une dualité épithélio-mésenchymateuse qui, lorsque dérégulée, serait impliquée dans la progression du cancer de l'ovaire.

CA125 est une glycoprotéine membranaire qui fait partie de la famille des mucines. Sa grande taille et ses propriétés ont rendues son étude relativement difficile. Ainsi, on ne connaît encore que très peu de choses au sujet de cette protéine. Présentement, CA125 a une grande utilité au niveau clinique chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire. La mesure des taux sériques de la protéine permet de suivre l'évolution d'une bonne proportion des cancers de l'ovaire en plus d'évaluer la réponse de la maladie aux traitements administrés (ALETTI *et al.*, 2007). CA125 est en fait étroitement lié au cancer de l'ovaire. On retrouve une expression membranaire de CA125 chez la majorité des cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire alors que la protéine n'est normalement pas exprimée par les OSE (AUERSPERG *et al.*, 2001; BAST *et al.*, 1983). Cette spécificité d'expression associée aux cellules cancéreuses pourrait signifier que CA125 jouerait peut être un rôle dans le développement et/ou la progression du cancer de l'ovaire.

Des expériences préalablement effectuées par le laboratoire à partir d'un modèle expérimental ont démontré que le knockdown de CA125 à la surface cellulaire diminue la tumorigénicité de la lignée cellulaire OVCAR-3. Cette diminution de la tumorigénicité est caractérisé par un changement de morphologie qui semble s'apparenté à une transition épithélio-mésenchymateuse, des modifications importantes au niveau des jonctions cellulaires, une réapparition de l'inhibition de contact et une augmentation de la sensibilité à différents agents génotoxiques utilisés en chimiothérapie. De plus, quelques expériences effectuées sur une

population stable SKOV-3 exprimant la partie CTD de CA125 ont démontré que cette portion de CA125 était en mesure d'augmenter la résistance des cellules à différents agents chimiothérapeutiques génotoxiques. Ainsi, mon projet avait pour objectif initial de poursuivre l'étude des effets du domaine CTD de CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité chez la lignée SKOV-3. La capacité de la portion CTD de CA125 à transformer différentes cellules immortalisées ou non a ensuite été évaluée. Les changements induits par l'expression de la portion CTD de CA125 chez différentes lignées cellulaires ont également été étudiés afin de déterminer les effets de l'expression de la portion CTD de la protéine chez les cellules.

42. Expériences faites avec les populations SKOV-3

42.1. Aucun effet sur la vitesse de croissance des cellules

La vitesse de croissance des différentes populations SKOV-3 a été évaluée à partir de courbes de croissance tracées à partir de comptes cellulaires. Les résultats obtenus indiquent que l'expression du domaine CTD de CA125 n'affecte pas la vitesse de croissance des cellules. Cependant, la population SKOV-3 CTD atteignait son plateau de croissance plus tardivement que les deux populations contrôles suggérant une diminution de l'inhibition de contact chez la population SKOV-3 CTD.

42.2. Diminution de l'inhibition de contact chez la population SKOV-3 CTD

Afin de mieux évaluer les effets du CTD de CA125 sur l'inhibition de contact, une expérience de formation de foyers post-confluence a été effectuée. Les résultats obtenus par cette expérience confirment les observations faites lors de l'évaluation de la vitesse de croissance des cellules. Ainsi, toutes les populations SKOV-3 étaient en mesure de former des foyers post-confluence. Cependant, l'expression du CTD de CA125 a favorisé une apparition plus rapide de foyers chez la population SKOV-3 CTD. De plus, la présence du CTD de CA125 a entraîné la formation de foyers post-confluence plus volumineux que ceux observés chez les populations contrôles. L'inhibition de contact des cellules est gérée par des signaux inhibiteurs de croissance qui peuvent prendre plusieurs formes. La diminution de l'inhibition de contact observée chez la population SKOV-3 CTD pourrait indiquer le domaine CTD de CA125 augmente l'insensibilité des cellules à différents signaux inhibiteurs de croissance. Parmi les signaux présents dans les conditions de culture utilisées, on retrouve l'interleukine-6 (IL-6), une cytokine naturellement sécrétée par les SKOV-3 et les signaux provenant des interactions cellule-cellule (HANAHAHAN et WEINBERG, 2000; RODECK, 1993; KERBEL, 1993; CHAN *et al.*, 2002). Lors de la culture régulière des cellules SKOV-3 contrôles, la croissance des cellules ralentissait lorsque la confluence des cellules atteignait 70%. Cet effet, absent chez la population SKOV-3 CTD, était éliminé par le rafraîchissement du milieu de culture des cellules. Ces observations suggèrent que le CTD de CA125

entraînerait une insensibilité à un facteur inhibiteur de croissance sécrété par les cellules et donc possiblement à l'IL-6. Des expériences supplémentaires sont cependant requises afin d'affirmer ce point.

42.3. Augmentation de la croissance en présence d'ancrage limité

Afin de continuer à évaluer les effets de la portion CTD de CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité, une expérience de croissance en agar mou a été effectuée. Toutes les populations étaient en mesure de former des colonies en agar mou. Cette observation correspond aux observations rapportées par la littérature (POPADIUK *et al.*, 2006; YAO *et al.*, 2007). Cependant, une quantité significativement plus élevée de colonies formées en agar mou a été observée chez la population SKOV-3 CTD. De plus, la taille des colonies de cellules formées par la population SKOV-3 CTD était nettement supérieure à celle des colonies formées par les populations contrôles. Ainsi, la présence du CTD de CA125 favorise la croissance des cellules en présence d'ancrage limité. Ceci pourrait indiquer que la portion CTD de CA125 favorise ou confère une certaine indépendance des cellules à différents signaux de croissance. Les cellules peuvent obtenir des signaux de croissance de plusieurs sources. Lors d'expériences de croissance en agar mou, on diminue grandement les signaux de croissance fournis par la matrice extracellulaire. Cette expérience peut aussi diminuer les signaux de croissance provenant des contacts intercellulaires puisque les cellules sont ensemencées isolées les unes des autres dans la matrice d'agar. Les observations

faites lors de cette expérience indiquent que la présence du CTD de CA125 aurait favorisé la croissance des cellules. À cause des restrictions imposées aux cellules par la matrice d'agar, il semble probable que cette plus forte croissance de la population SKOV-3 CTD ait été causé par une augmentation de l'indépendance des cellules à différents signaux de croissance induite par la présence du CTD de CA125. Les conditions de culture imposées aux cellules dans ce type d'expérience sont également similaires à une absence totale d'ancrage. Ainsi, les résultats pourraient également suggérer que l'expression du domaine CTD de CA125 entraîne une résistance à l'anoïkose. Par conséquent, le domaine CTD de CA125 pourrait favoriser indirectement la formation de métastases. Cependant, cette hypothèse reste à vérifier.

42.4. La portion CTD de CA125 augmente la tumorigénicité des cellules chez les souris NUDE

Les cellules doivent développer de nombreux avantages avant d'arriver à former une tumeur chez l'animal. Bien que le système immunitaire des souris NUDE soit déficient, l'utilisation de ce modèle permet la comparaison de la tumorigénicité de différentes populations cellulaires. L'expérience effectuée chez les souris NUDE a permis d'observer que l'expression de la portion CTD de CA125 augmente la tumorigénicité des cellules. Ainsi, les tumeurs sous-cutanées formées par la population SKOV-3 CTD étaient significativement plus massives ($p = 0,0001$) et apparaissaient beaucoup plus tôt que celles retrouvées chez les populations

contrôles. Cette observation semble en accord avec les différentes observations faites lors des expériences qui visaient à étudier l'influence du CTD de CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité. Il est possible que les avantages que semble conférer le CTD de CA125 tels que la diminution de l'inhibition de contact, l'indépendance des signaux inhibiteurs de croissance et l'indépendance des signaux de croissance aient favorisés la croissance des cellules chez les souris NUDE. Des résultats similaires chez les SKOV-3 ont déjà été obtenus avec une autre mucine transmembranaire surexprimée dans le cancer de l'ovaire, soit MUC13. Les recherches effectuées chez cette mucine suggèrent que les effets de la protéine passent par l'activation des voies de signalisation de c-jun N-terminal kinase (JNK), p21-activated kinase 1 (PAK1) et p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (CHAUHAN *et al.*, 2009). Il pourrait être intéressant de vérifier l'activation de ces voies de signalisation en réponse à l'expression du CTD de CA125.

42.5. La portion CTD de CA125 diminue le temps de survie des souris SCID

Les stades avancés des cancers de l'ovaire sont souvent caractérisés par la présence de métastases intrapéritonéales. Ainsi, les effets du CTD de CA125 sur la formation de tumeurs dans la cavité intrapéritonéale de souris SCID ont été étudiés. Comme observé chez les souris NUDE, les tumeurs cancéreuses se sont développées plus rapidement chez les souris injectées avec la population SKOV-3

CTD comparativement aux souris injectées avec les cellules contrôles. Une plus grande quantité d'implants macroscopiques a été observée chez les souris CTD par rapport aux souris contrôles euthanasiées à des fins de comparaison. La période de survie des souris CTD était également nettement inférieure à celle des souris contrôles soit 29,6 jours en moyenne chez les souris CTD et 42,2 jours et 47,3 jours chez les deux groupes de souris contrôles. Chez toutes les souris, des tumeurs ont été retrouvées sur différentes structures et différents organes présents dans la cavité intrapéritonéale dont le foie, les reins, les intestins, la rate, l'estomac et le diaphragme. Les métastases observées étaient implantées à la surface des organes et s'y seraient vraisemblablement réparties par dissémination dans la cavité intrapéritonéale et non à travers l'infiltration d'un système circulatoire. Aucun avantage d'invasion ou de dissémination n'a été observé chez la population SKOV-3 CTD. Des expériences supplémentaires seraient cependant nécessaires pour écarter un rôle possible du CTD de CA125 au niveau de la dissémination et de l'invasion des cellules cancéreuses.

43. Infection des lignées cellulaires non-transformées immortalisées ou non HFL-1 et NIH 3T3

Les expériences faites chez les populations SKOV-3 ont démontrées que le CTD de CA125 confère de nombreux avantages aux cellules. Ces observations semblent indiquer que CA125 pourrait être un oncogène et que son domaine CTD serait suffisant à l'octroi de plusieurs caractéristiques associées à la tumorigénicité. Les

oncogènes peuvent engendrer différents effets chez les cellules. Certains oncogènes agissent conjointement avec d'autres pour attribuer différentes caractéristiques aux cellules. Également, il existe une minorité d'oncogènes qui, même seuls, sont capables de transformer des cellules tels que Fos et Ras (LI *et al.*, 2003; HANAHAN et WEINBERG, 2000; CROCE, 2008; ORDWAY *et al.*, 2004). Les effets de certains oncogènes peuvent varier d'un type de cellule à un autre (FELSHER, 2008). Afin de mieux définir les caractéristiques conférées par le CTD de CA125 et de mieux vérifier s'il s'agit d'un oncogène, des expériences de transformation de cellules immortalisées ou non ont été effectuées. Conjointement, différentes expériences étudiant les caractéristiques associées à la tumorigénicité ont été effectuées chez des cellules non-transformées immortalisées ou non.

Une cellule est dite transformée lorsqu'elle développe une certaine indépendance face aux différents signaux régulant sa prolifération. Pour vérifier la capacité de la portion CTD de CA125 à transformer des cellules en cellules cancéreuses, les lignées NIH 3T3 et HFL-1 ont été infectées. Les NIH 3T3 sont des cellules immortalisées couramment utilisées lors d'expériences de transformation par des protéines potentiellement oncogéniques (RUBIN et XU, 1989). Advenant l'acquisition de caractéristiques tumorigéniques générées par l'expression de la portion CTD de CA125, l'utilisation des NIH 3T3 aurait permis une comparaison des propriétés acquises avec de nombreuses protéines oncogéniques testées dans les mêmes cellules par d'autres laboratoires dont la mucine MUC4 (BAFNA *et al.*, 2008).

43.1. Aucun effet du CTD de CA125 chez les NIH 3T3

L'efficacité d'infection des cellules NIH 3T3 a d'abord été évaluée par l'expression de la protéine GFP chez les populations contrôles NIH 3T3 GFP. Les résultats obtenus indiquent une faible efficacité d'infection de la lignée NIH 3T3 par les vecteurs lentiviraux (figure 27). Des résultats similaires sont rapportés par le manuel *Lentivector Expression Systems : Guide to Packaging and Transduction of target Cells* de System Biosciences. Selon les données présentées par ce manuel, les vecteurs lentiviraux sont généralement moins efficaces chez les lignées cellulaires d'origines murines dont les NIH 3T3. La faible efficacité d'infection des NIH 3T3 a ensuite été confirmée par RT PCR et par Western. Une très faible expression du mARN de la construction a été observée et ce, seulement chez la population NIH 3T3 CTD2II (figure 29) et aucune expression protéique de la construction CTD2 n'a été observée (figure 30). Il est possible qu'une faible expression protéique de la construction CTD2 ait été masquée par la présence de petites bandes non spécifiques à la hauteur attendue de la protéine. Cependant, l'analyse des résultats tend à indiquer une très faible expression de la protéine.

Malgré la faible expression de la construction CTD2 chez les NIH 3T3, les cellules ont été régulièrement observées au microscope afin de détecter tout changement morphologique ou phénotypique. En effet, puisqu'une transformation implique un avantage prolifératif et souvent un changement de morphologie, la présence de foyers de transformation aurait vraisemblablement été visible avec le temps malgré

la faible efficacité d'infection des cellules. Aucun foyer de transformation, aucune différence dans la vitesse de croissance et aucun changement de morphologie spécifique aux populations NIH 3T3 CTD2 n'ont été observés (figure 28). Une expérience de formation de foyers post-confluence a été effectuée avec les différentes populations NIH 3T3. En théorie, les restrictions imposées aux cellules lors de ce type d'expérience auraient pu favoriser l'émergence de cellules résistantes à l'inhibition de contact et dotées d'un avantage prolifératif induit par l'expression du CTD de CA125. Encore une fois, il n'y avait aucune différence entre les différentes populations NIH 3T3 et aucun foyer post confluence n'a été observé.

43.2. L'expression du CTD de CA125 induit un léger changement de morphologie chez les cellules HFL-1

Chez les HFL-1, une excellente efficacité d'infection a été observée à partir des populations contrôles GFP (figure 27). La bonne expression de la construction CTD a par la suite été confirmée par RT PCR et par Western (figure 29 et figure 30). Lors de la validation par Western, de fortes bandes de poids moléculaires commençant de l'extrémité inférieure du gel jusqu'à un poids moléculaire de plus de 72 kDa ont été observées uniquement chez les populations HFL-1 CTD2 (figure 30). Des validations par Western préalablement effectuées sur des populations CTD2 établies à partir des lignées cancéreuses de l'ovaire SKOV-3 et CaOV-3 (données non présentées) ont permis d'identifier une seule bande de 55 kDa comme

étant la construction CTD2. La présence de fortes bandes de poids moléculaires variables chez les populations HFL-1 CTD2 était donc surprenante. L'absence de bandes non spécifiques chez les populations HFL-1 GFP (figure 30) et chez les autres populations contrôles (données non illustrées) permet d'associer les bandes des populations HFL-1 CTD2 à l'expression de leur construction. Différentes conditions ont par la suite été essayées afin de clarifier la bande correspondante au CTD chez les populations CTD dont une immunoprécipitation (résultats non illustrées), l'utilisation d'autres anticorps primaires contre l'étiquette myc de la construction (résultats non illustrées) ainsi que l'utilisation d'un anticorps contre l'étiquette His₆ de la construction (résultats non illustrées). Malgré les différentes conditions essayées, des résultats similaires ont été obtenus à chaque expérience de validation des populations HFL-1 CTD2. Des bandes similaires ont par la suite été observées chez toutes les populations CTD2 établies à partir de cellules non-transformées immortalisées ou non d'origine humaine. Bien que la nature de ces bandes associées à la construction CTD2 demeure un peu mystérieuse, leur expression semble confirmer l'expression de la construction CTD2 et donc valider l'expression protéique de la portion CTD de CA125 chez les populations HFL-1. Une hypothèse sur la nature de ces bandes est suggérée dans la prochaine section.

Une légère modification morphologique a été observée chez les populations HFL-1 CTD2 (figure 28). La morphologie déjà fibroblastique des cellules a semblé être accentuée par la présence de la portion CTD de CA125. Ce changement de morphologie pourrait indiquer une augmentation des capacités de migration des

cellules. La littérature rapporte que d'autres mucines transmembranaires, MUC1 et MUC13, semblent également augmenter la migration cellulaire (CHAUHAN *et al.*, 2009; YUAN *et al.*, 2007). Malheureusement, cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée à cause de l'entrée rapide des cellules en sénescence.

Aucun indice pouvant indiquer une augmentation de la tumorigénicité chez les populations HFL-1 CTD2 n'a été observé. De plus, la construction CTD2 n'a pas semblé en mesure de transformer les cellules ou de retarder leur entrée en sénescence. Cependant, aucune transformation de HFL-1 par transfection d'un oncogène n'a été retrouvée dans la littérature. En effet, les cellules d'origine humaine sont plus difficiles à transformer que celles de rongeurs (BALMAIN et HARRIS, 2000). C'est pourquoi des lignées cellulaires de rongeurs sont généralement utilisées lors d'expériences de transformation avec des protéines potentiellement oncogéniques. Les chercheurs ayant effectués des expériences de transformations avec les mucines MUC1 et MUC4 ont d'ailleurs utilisé des cellules de rongeurs (LI *et al.*, 2003; DURAISAMY *et al.*, 2006; BAFNA *et al.*, 2008). Il est donc difficile d'évaluer l'habileté du CTD de CA125 à transformer des cellules en fonction des résultats obtenus avec les HFL-1.

44. Hypothèse sur les bandes observées par Western

Une hypothèse a été avancée pour expliquer la présence des fortes bandes associées aux populations CTD2 retrouvées lors de la validation des cellules non-

transformées d'origine humaine. Les analyses d'efficacité d'infection effectuées avec les populations GFP ont démontrées que les lentivirus utilisés étaient particulièrement efficaces chez ces cellules. Or, seules ces lignées cellulaires présentaient un patron de bandes multiples fortement exprimées chez les populations CTD2. Une concentration importante de la protéine semble donc nécessaire à l'apparition de bandes multiples associées à la construction CTD2. Le poids moléculaire estimé pour la construction CTD est de 37 kDa. Cependant, ce domaine contient des sites potentiels de glycosylations et plusieurs sites potentiels de phosphorylation soit trois tyrosines, deux thréonines et une sérine (O'BRIEN *et al.*, 2001; YIN et LLOYD, 2001). Ainsi, quelques possibilités pourraient expliquer les différents poids moléculaires des bandes associées à la construction CTD2. Lorsqu'une faible quantité de protéines provenant des populations CTD2 est déposée sur gel (comme à la figure 35), on observe que les bandes sont regroupées en trois séries de doublets. Sur le gel de la figure 25, on peut voir un premier doublet formé de bandes à 24 kDa et à 34-35 kDa et un deuxième doublet formé de bandes à 60 et à 69-70 kDa. Le troisième doublet est plus faiblement exprimé mais il apparaît à 115 kDa et 125 kDa lorsque le film est exposé plus longtemps à la membrane.

Chez les SKOV-3, une bande unique correspondant à la construction CTD2 a été observée à un peu plus de 55 kDa (figure 30). Si on tient compte des différences de migration qui proviennent des différents temps alloués pour la migration, cette bande correspondrait vraisemblablement à la bande de 60 kDa de la figure 35. On

retrouve donc un doublet formé de bandes de tailles inférieures à la construction CTD2 et un doublet formé de bandes de tailles supérieures à la construction CTD2. Le doublet de tailles inférieures à la construction CTD2 pourrait représenter un clivage de la construction. Un site d'homologie à un domaine SEA se trouve d'ailleurs dans la construction CTD2. Les domaines SEA ont déjà été identifiés chez plusieurs mucines comme étant des sites de clivage potentiel (MACAO *et al.*, 2006). Le clivage du domaine SEA présent dans la construction CTD2 donnerait vraisemblablement un fragment C-terminal d'une taille d'environ 23-25 kDa ce qui correspond à la taille de la bande inférieure du doublet de plus petite taille. Il est à noter que le fragment N-terminal généré par ce clivage ne peut être visualisé puisque celui-ci ne comporte pas d'étiquette qui en permettrait la détection. Des bandes similaires à celles obtenues avec la construction CTD de CA125 ont d'ailleurs été observées chez la mucine MUC1, une autre mucine transmembranaire exprimée par de nombreux cancers. Chez cette mucine, un doublet situé entre 24-36 kDa a été observé lors de l'utilisation d'un anticorps spécifique à la queue cytoplasmique de la protéine (CROCE *et al.*, 2003; WEN *et al.*, 2003; REN *et al.*, 2006). Les chercheurs qui ont observés ce doublet ont également avancé l'hypothèse d'un clivage de la protéine (CROCE *et al.*, 2003; WEN *et al.*, 2003; ANDERSCH-BJÖRKMAN *et al.*, 2007).

Le doublet de taille supérieure quant à lui pourrait être le résultat d'une dimérisation de la protéine. En effet, ce doublet semble avoir un poids moléculaire deux fois plus important que le doublet qui correspond à la construction CTD2. Des

dimérisations non réductibles par les différentes conditions dénaturantes typiquement utilisées lors d'analyse Western ont déjà été observées chez différentes mucines (ANDERSCH-BJÖRKMAN *et al.*, 2007; AXELSSON *et al.*, 1998).

En ce qui a trait à l'apparition des différentes bandes sous forme de doublets, différentes modifications post-traductionnelles pourraient expliquer leur présence. Ainsi, les mucines font souvent l'objet de nombreuses glycosylations et parfois même de phosphorylations. On sait d'ailleurs que CA125 comprend de nombreuses glycosylations en O et en N et que cette protéine comprend plusieurs sites potentiels de phosphorylation (O'BRIEN *et al.*, 2001). Les mêmes modifications post-traductionnelles semblent présentes chez les trois doublets observés puisqu'une taille constante de 10 kDa sépare les bandes. Cette différence de taille pourrait être reliée à des glycosylations du domaine unique de la construction CTD2. Également, la bande supérieure des doublets (figure 35, bande de 34-35 kDa et bande de 69-70 kDa) semble elle-même être une double bande. Cette double bande pourrait être la conséquence d'une autre modification post-traductionnelle telle qu'une phosphorylation de la protéine.

Il serait intéressant de vérifier ces hypothèses lors de prochaines expériences. Des digestions par des glycosydases et des phosphatases pourraient permettre de vérifier la nature des modifications post-traductionnelles observées chez les constructions CTD2. Les différentes bandes protéiques associées à la construction pourraient également être séquencées afin de confirmer leur identité.

45. Peu d'effet du CTD de CA125 chez des OSE

La construction CTD2 n'était pas suffisante pour induire la transformation des lignées NIH 3T3 et HFL-1. Cependant, bien que CA125 puisse être exprimé par différents tissus, son expression pathologique est généralement associée aux cellules épithéliales cancéreuses de l'ovaire. Afin de vérifier si les effets pathologiques de CA125 sont exclusifs aux cellules épithéliales de l'ovaire, des OSE ont été infectées avec les lentivirus contrôles et les lentivirus CTD2. Les OSE utilisées étaient les OVN221T, les OVN225T et les OVN321T.

Comme c'était le cas chez les HFL-1, une très bonne efficacité d'infection a été observée chez les différentes cellules OSE à partir des populations GFP (figure 32). Des expériences de validation pour les populations OVN221T CTD2 ont ensuite été effectuées. La validation des cellules OVN225T et des cellules OVN321T s'est cependant avérée impossible à cause de l'entrée trop rapide des cellules en sénescence. Chez les OVN221T une entrée en sénescence plus tardive a permis de valider les populations OVN221T CTD2 par RT PCR et par Western (figure 34 et figure 35).

L'entrée rapide en sénescence des différentes OSE étudiées a empêché une analyse poussée des cellules à travers différentes expériences. Cependant, différentes observations ont été effectuées lors de la culture des populations contrôles et CTD2 établies à partir des différentes OSE étudiées.

Chez les OVN221T, aucun effet sur des caractéristiques pouvant affecter la tumorigénicité des cellules n'a été observé lors de la culture des cellules. Cependant, tel qu'observé chez les populations HFL-1 CTD2, un allongement des cellules a été observé chez les populations OVN221T CTD2 (figure 33). Encore une fois, il est possible que ce changement de morphologie indique une augmentation des capacités de migration des cellules. Malheureusement, aucune expérience de migration n'a pu être effectuée avant l'entrée des cellules en sénescence. La présence du CTD de CA125 n'a pas non plus ralenti ou empêché l'entrée en sénescence des cellules. Ces résultats concordent avec ceux obtenus avec les lignées cellulaires NIH 3T3 et HFL-1 qui n'avaient pas été immortalisées ou transformées par la construction CTD2.

Bien que les lignées OVN225T et OVN321T soient entrées en sénescence avant même la validation de leurs populations, quelques observations ont pu être notées chez ces cellules. La vitesse de croissance et l'inhibition de contact des cellules étaient difficilement évaluables à cause de l'entrée rapide des cellules en sénescence. Un allongement des cellules vers une morphologie plus fibroblastique a cependant été observé chez les populations OVN225T CTD2. Cette observation vient appuyer les observations similaires faites chez les populations CTD2 des HFL-1 et des OVN221T. L'absence de changement morphologique chez les OVN321T CTD2 pourrait être reliée à la proximité des cellules de leur sénescence. En fonction de l'entrée rapide des cellules en sénescence, la portion CTD de CA125 ne semble pas avoir été en mesure d'immortaliser les cellules ou de ralentir leur

entrée en sénescence. Les résultats obtenus chez les lignées cellulaires OVN225T et OVN321T doivent bien entendu être interprétés avec réserve puisque la validation de leurs populations CTD2 n'a pas pu être effectuée.

Globalement, les résultats obtenus avec les OSE n'ont pas permis d'associer la portion CTD de CA125 à différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité. Cependant, il apparaît évident que la présence de la portion CTD de CA125 semble induire un changement de morphologie reproductible chez les différentes populations. Les populations CTD2 adoptent généralement une morphologie plus fibroblastique qui pourrait indiquer une augmentation de la capacité de migration des cellules à travers une augmentation des caractéristiques mésenchymateuses des cellules. Toutefois, l'entrée rapide en sénescence des cellules non-immortalisées n'a pas permis la vérification de cette hypothèse. L'ensemble des résultats obtenus avec les NIH 3T3, les HFL-1, les OVN221T, les OVN225T et les OVN321T indiquent également que la portion CTD de CA125 n'est pas suffisante pour induire une transformation de cellules en cellules cancéreuses. Cependant, vu l'origine humaine de la majorité de ces cellules, les résultats peuvent difficilement être comparés aux expériences de transformation traditionnelles retrouvées dans la littérature. Il est possible que d'autres modifications cellulaires soient nécessaires pour que la portion CTD de CA125 puisse transformer les cellules ou que celle-ci agisse indirectement en affectant des fonctions telles que la réparation de l'ADN. La séquence de CA125 exprimée par la construction CTD2 comprend en effet un

signal potentiel de localisation nucléaire qui pourrait indiquer une fonction au niveau du noyau.

46. Infections des OVN95T hTERT et des OVN211T hTERT

Afin de permettre une analyse plus approfondie des effets de la portion CTD de CA125, des OSE immortalisées par l'expression de la télomérase ont été utilisées. Les expériences effectuées visaient à vérifier les effets de la construction CTD2 sur différents caractéristiques qui peuvent influencer la tumorigénicité des cellules. La migration des cellules, l'expression de différentes molécules d'adhésion et l'expression de différentes protéines structurales ont également été étudiés. Comme c'était le cas lors des expériences précédentes, les cellules ont été étroitement suivies afin de détecter d'éventuelles caractéristiques pouvant indiquer une transformation des populations CTD2. En effet, l'utilisation de cellules immortalisées aurait pu faciliter la transformation des cellules par la portion CTD de CA125.

Comme pour toutes les cellules d'origine humaine infectées avec les lentivirus lors de ce projet, une excellente efficacité d'infection a été observée chez les OVN95T hTERT et les OVN211T hTERT (figure 36). Cette efficacité d'infection a été confirmée par la validation de l'expression de la construction CTD chez les populations OVN95T hTERT CTD2 (figure 38, figure 39 et figure 40) et chez les populations OVN211T hTERT CTD2 (figure 40).

L'IF effectuée chez ces cellules a également permis de visualiser la localisation de la construction CTD au niveau des cellules OVN95T hTERT et des cellules OVN211T hTERT (figure 40). Aucune différence de localisation ou de force d'expression de la construction CTD n'a été observée entre les différentes populations CTD2. La protéine découlant de la construction CTD semble exprimée à plusieurs endroits chez les cellules (figure 40). Comme prévu, la protéine semble localisée au moins en partie à la membrane. La présence de la protéine au niveau du cytoplasme des cellules pourrait simplement représenter la voie de sécrétion empruntée par la protéine pour rejoindre la membrane cellulaire ou une internalisation de la protéine. Admettant un clivage de la protéine (section 44), celui-ci pourrait jouer un rôle dans l'internalisation de la protéine. L'internalisation d'une partie d'une construction de la portion C-terminal de MUC1 a déjà été démontrée (REN *et al.*, 2006). Chez cette mucine dotée d'un signal potentiel de localisation nucléaire RRK, la portion internalisée est dirigée vers le noyau et les mitochondries (HUANG *et al.*, 2003; REN *et al.*, 2004). Malgré la présence du signal potentiel de localisation nucléaire RRRKK dans le domaine CTD de CA125, aucune localisation nucléaire n'a été observée chez les populations CTD2. Il serait intéressant de vérifier si la perméabilisation effectuée sur les cellules lors des IF permet bel et bien le marquage de protéines qui se trouvent dans le noyau. Chez certaines cellules, un marquage au niveau de la membrane nucléaire a tout de même été observée (figure 40). Une localisation similaire d'une construction de la mucine transmembranaire MUC13 est également décrite par la littérature chez des cellules SKOV-3 (CHAUHAN *et al.*, 2009)

Comme chez les cellules précédentes, aucune différence au niveau de la vitesse de croissance des cellules n'a été observée lors de leur culture. Au niveau morphologique, les populations CTD2 des OVN95T hTERT et des OVN211T hTERT ont à nouveau adopté une morphologie allongée (figure 37). Ce changement de morphologie reproductible est particulièrement intrigant puisque dans la littérature, on considère souvent CA125 comme un marqueur épithélial (JACOB et BAST, 1989; WONG et AUERSPERG, 2003). L'association d'une morphologie mésenchymateuse à l'expression de la portion CTD de CA125 est donc paradoxale.

Les résultats obtenus lors de ce mémoire ne permettent pas en soit d'éclaircir ce mystère. L'hypothèse suivante a tout de même été élaborée en fonction de certaines observations faites lors des expériences et de certaines remarques retrouvées dans la littérature. En fonction du clivage possible de la protéine observé lors de la validation par Western, il est possible que CA125 sous sa forme complète soit associé à une morphologie épithéliale des cellules mais que le clivage de la protéine entraîne une EMT chez les cellules et donc un allongement de celles-ci. En effet, bien qu'une augmentation sérique de CA125 ait été observée chez les patientes atteintes de cancers de l'ovaire avancés, on observe parfois une diminution du CA125 membranaire des tumeurs et parfois même une absence de la protéine (HØGDALL *et al.*, 2007). Puisque les anticorps contre CA125 sont uniquement dirigés contre la partie extracellulaire de la protéine la perte d'expression membranaire de CA125 chez les tumeurs de stades avancés pourrait en fait être un

clivage, possiblement au niveau du domaine SEA retrouvé dans la construction CTD, et un relâchement du domaine N-terminal de la protéine. Ainsi, selon l'hypothèse avancée ici, le clivage de CA125 qui entraînerait une augmentation de l'expression exclusive de la portion CTD de CA125 entraînerait une EMT des cellules et une augmentation de leur migration et de leur invasion.

47. Expériences de transformation chez les OVN95T hTERT

L'immortalité des OVN95T hTERT a permis d'effectuer des expériences de transformation plus poussées et d'évaluer le rôle que pourrait jouer CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité. Comme chez toutes les autres cellules non-transformées infectées avec les lentivirus CTD2, la culture cellulaire n'a pas permis de faire transparaître une différence entre les différentes populations de cellules. Des expériences de transformation et des expériences visant à vérifier différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité ont donc été effectuées sur les différentes populations de cellules OVN95T hTERT.

47.1 Aucun effet du CTD de CA125 sur la formation de foyers post confluence chez les OVN95T hTERT

Une expérience de foyers post-confluence a d'abord été effectuée afin de vérifier les effets du CTD de CA125 sur la transformation des cellules. Comme observé lors de la culture cellulaire, aucune différence n'a été observée entre les populations

contrôles et les populations CTD2 (figure 41). Les différentes populations d'OVN95T hTERT n'étaient pas en mesure de former des foyers de croissance après l'atteinte de la confluence. Les résultats obtenus étaient attendus puisque les OVN95T hTERT sont des cellules non-transformées et que théoriquement, les cellules non-transformées ne forment pas de foyers post-confluence. Cependant, les résultats obtenus semblent démontrer que la portion CTD de CA125 n'est pas en mesure de transformer des OSE immortalisées. De plus, aucun effet sur l'inhibition de contact des cellules n'a été observé lors de l'expérience.

47.2 L'expression du CTD de CA125 ne permet pas aux cellules de croître en agar mou

Afin d'appuyer les résultats précédents, l'habileté des cellules à croître en présence d'ancrage limité a été vérifiée par une expérience de croissance en agar mou. Aucune des populations d'OVN95T hTERT n'a été en mesure de former des colonies en agar mou. Ces résultats indiquent que la portion CTD de CA125 n'est pas en mesure de permettre aux cellules individuelles de croître en absence d'ancrage. Cette absence de croissance appuie également les différentes observations qui indiquent que la portion CTD de CA125 n'a pas été en mesure de transformer les cellules.

48. Évaluation des effets du CTD de CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité

Même si les résultats obtenus avec les OVN95T hTERT indiquent que le CTD de CA125 n'est pas en mesure de transformer les cellules, la protéine pourrait tout de même avoir certain effet sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité. En effet, les protéines qui influencent différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité ne sont pas nécessairement en mesure de transformer des cellules. Des expériences visant à étudier les effets du CTD de CA125 sur différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité ont donc été effectuées.

48.1. L'expression du CTD de CA125 n'influence pas la formation de sphéroïdes chez les OVN95T hTERT

Une particularité souvent présente chez les patientes atteintes de cancers de l'ovaire est la présence d'ascite dans la cavité intrapéritonéale. L'ascite retrouvée chez ces patientes contient souvent des agrégats de cellules cancéreuses qui se sont détachées de la tumeur primaire et qui peuvent entraîner la formation de métastases. La formation de ces agrégats, aussi appelés sphéroïdes, pourrait augmenter la résistance des cellules à l'anoïkose grâce aux interactions cellules-cellules qui s'y forment. Une expérience visant à vérifier l'habileté des différentes populations OVN95T hTERT à former des sphéroïdes a été effectuée. Indépendamment de la population, toutes les cellules ont été en mesure de former des sphéroïdes compacts

après seulement 24 heures d'incubation (figure 42). Les sphéroïdes ont été gardés en culture pendant 144 heures. Pendant cette période, la taille des sphéroïdes semblait demeurer relativement stable suggérant que les OVN95T hTERT n'étaient pas en mesure de proliférer sous forme de sphéroïdes. Après 144 heures d'incubation, l'intégrité des sphéroïdes semblait la même qu'après 24 heures d'incubation et la viabilité des cellules ne variait pas d'une population cellulaire à une autre (figure 43). Les expériences de formation de sphéroïdes ont également démontrées que les sphéroïdes formés par les différentes populations se désagrégeaient facilement avec un simple pipetage. Les caractéristiques des sphéroïdes formés par les OVN95T hTERT ne correspondent pas à celles des sphéroïdes formés par des lignées cancéreuses de l'ovaire. Bien que leur apparence soit similaire, les sphéroïdes des cellules cancéreuses de l'ovaire sont formés de cellules qui arrivent à proliférer pendant environ 10 jours (SHIELD *et al.*, 2007). Cette prolifération est caractérisée par une augmentation graduelle de la taille des sphéroïdes en culture (SHIELD *et al.*, 2007). De plus, les sphéroïdes formés par des lignées cancéreuses sont habituellement difficiles à désagréger (AHMED *et al.*, 2007; SHIEL *et al.*, 2009). L'expression de la portion CTD de CA125 ne semble donc pas avoir favorisé la survie, la prolifération ou la force des interactions cellules-cellules. Une différence au niveau des sphéroïdes formés par les populations CTD de CA125 aurait pu indiquer un rôle de la protéine dans la dissémination du cancer de l'ovaire. Bien que les résultats obtenus ne puissent pas exclure cette hypothèse, aucun indice appuyant celle-ci n'a été noté.

48.2. La clonogénicité sur plastique des OVN95T hTERT n'est pas modifiée par l'expression du CTD de CA125

Les signaux de survies qui proviennent de l'adhésion des cellules à une matrice ou des interactions cellules-cellules peuvent jouer un rôle critique au niveau de la survie des cellules. Ainsi, la capacité des cellules à adhérer rapidement à une matrice et la capacité des cellules à croître à faible densité sont des facteurs qui peuvent influencer la survie d'une population de cellules et limiter la dissémination d'un cancer.

Une expérience de clonogénicité sur plastique a été effectuée sur les différentes populations OVN95T hTERT. Les résultats obtenus ont encore une fois indiqués l'absence de différences entre les différentes populations OVN95T hTERT (figure 44). Ainsi, la portion CTD de CA125 ne semble pas avoir favorisée l'adhésion cellulaire ou la prolifération à faible densité. La taille et le nombre de colonies formées était approximativement la même d'une population cellulaire à une autre. Ainsi, la présence du CTD de CA125 ne semble pas favoriser la clonogénicité sur plastique des cellules. Une plus grande quantité de colonie formée par les populations OVN95T hTERT CTD2 ou une plus grande taille de ces colonies aurait pu indiquer un effet du CTD sur le potentiel de dissémination des cellules.

48.3. Le CTD de CA125 n'influence pas la migration des OVN95T hTERT

La migration cellulaire est un processus biologique important. Chez les OSE, la migration facilite entre autre la réparation de la monocouche de cellules épithéliales recouvrant l'ovaire qui est endommagée lors des ovulations. Au niveau du cancer, la migration des cellules est souvent centrale à la formation de métastases (figure 3). Elle permet aux cellules cancéreuses de quitter la tumeur primaire et de s'implanter dans un nouvel endroit. La migration est donc une caractéristique qui peut affecter la tumorigénicité des cellules.

Lors de l'établissement des populations CTD2 dans les différentes cellules, un changement de morphologie a fréquemment été observé. Ce changement de morphologie était caractérisé par un allongement des cellules vers une forme plus fibroblastique. Puisqu'une telle morphologie est souvent associée à une augmentation de la migration cellulaire chez les OSE, une expérience de migration par blessure de monocouche cellulaire a été effectuée. Bien que sur les photos présentées la population CTD semble peut être avoir un peu plus migré, l'ensemble des expériences effectuées indiquent qu'il n'y avait aucune différence entre les capacités migratoires des différentes populations (figure 45). Une augmentation de la migration chez les populations CTD aurait pu impliquer une augmentation du potentiel de dissémination des cellules induite par la portion CTD de CA125.

La comparaison des populations OVN95T hTERT CTD2 avec leurs populations contrôles n'était peut être pas adéquate. En effet, tel que décrit dans l'introduction, les OSE sont des cellules dotées d'une dualité épithélio-mésenchymateuse et adoptent rapidement une morphologie mésenchymateuse en culture. Des conditions analogues à celles retrouvées à la surface de l'ovaire lors d'une ovulation expliqueraient ce changement de morphologie induit par les conditions de culture cellulaire (AUERSPERG *et al.*, 2001). Les résultats obtenus avec les différentes cellules indiquent que la portion CTD de CA125 pourrait induire certaines caractéristiques associées à une EMT. Malheureusement, les conditions de culture induisent elles aussi une EMT chez les OSE et donc, chez les populations contrôles (WONG et AUERSPERG, 2003). Ce phénomène chez les populations contrôles pourrait avoir masqué certaines caractéristiques acquises par les populations CTD2.

À la lumière des faits énumérés lors du paragraphe précédent, il est possible que le CTD de CA125 ait un effet sur la migration des cellules mais que cet effet ait été masqué par la comparaison avec les populations contrôles. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse avec une lignée cellulaire dotée d'une morphologie épithéliale stable qui n'exprime pas CA125. L'utilisation de chambre de Boyden avec couche de matrigel pourrait également permettre de vérifier quantitativement la migration cellulaire et la capacité d'invasion des cellules.

49. Le CTD de CA125 n'influence pas la résistance au cisplatine des OVN95T hTERT

La sensibilité des cellules au cisplatine, un agent chimiothérapeutique utilisé dans le traitement du cancer de l'ovaire, a été analysée. En effet, lors d'expériences préalablement effectuées dans le laboratoire, le CTD de CA125 exprimé chez des cellules cancéreuses de l'ovaire semblait entraîner une résistance à certains agents chimiothérapeutiques dont le cisplatine (BOIVIN, 2005). Les résultats obtenus n'indiquent aucune différence dans la sensibilité des cellules au cisplatine entre les différentes populations OVN95T hTERT (figure 46). Il est possible que les effets du CTD de CA125 sur la résistance des cellules à différents agents génotoxiques soient plus facilement visibles chez les cellules cancéreuses. Bien entendu, les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux différents agents chimiothérapeutiques que les cellules normales. Il est donc possible que les effets du CTD de CA125 sur la résistance au cisplatine ne soient pas présents chez les cellules non-transformées qui sont déjà résistantes aux différents agents utilisés en chimiothérapie.

50. Analyse des jonctions cellulaires

Les nombreuses expériences effectuées sur les différentes populations OVN95T hTERT n'ont démontrées que très peu de différences entre les populations CTD2 et les populations contrôles. Seul un changement de morphologie semble distinguer les populations CTD2 des populations contrôles. Chez les cellules, les changements

de morphologies impliquent souvent des modifications au niveau des interactions cellules-cellules et donc au niveau des jonctions cellulaires et au niveau du cytosquelette. Afin de mieux comprendre le changement de morphologie des populations CTD2, les jonctions cellulaires présentes chez les différentes populations ont été analysées.

50.1. Aucune différence entre les différentes populations par microscopie électronique transmission

Les jonctions présentes chez les différentes populations ont d'abord été directement visualisées par microscopie électronique à transmission (figure 47). Aucune différence dans le type ou la fréquence des jonctions cellulaires observées n'a été observée entre les différentes populations OVN95T hTERT. Ainsi, le changement de morphologie observé chez les populations OVN95T hTERT CTD ne semble pas avoir été accompagné par des modifications. De telles modifications avaient pourtant été observées précédemment par notre laboratoire lors d'expériences faites avec un modèle knockdown. Chez ce modèle, le knockdown de CA125 avait entraîné une forte diminution des jonctions cellulaires et une augmentation de l'espace entre les cellules (COMAMALA, en préparation). Cependant, il est possible que les différences entre les populations aient été masquées par une EMT des populations contrôles induite par les conditions de culture cellulaire.

50.2. L'expression de la N-cadhérine et de la E-cadhérine n'est pas influencée par la portion CTD de CA125

La localisation et le patron d'expression de différentes protéines normalement impliquées au niveau des jonctions cellulaires ont été vérifiés par IF. L'expression de la N-cadhérine et de la E-cadhérine a également été analysée quantitativement par Western. Chez les OSE, l'expression et la concentration de ces protéines permet également de détecter une évolution des cellules vers un état métaplasique (AUERSPERG *et al.*, 2001).

Comme c'est le cas chez les OSE décrites dans la littérature, la N-cadhérine était exprimée chez les différentes populations OVN95T hTERT (figure 48 et figure 49). Par IF, une légère diminution de l'intensité de marquage de la protéine semblait présente chez les populations OVN95T hTERT CTD2 (figure 48). Cependant, aucune différence d'expression n'a été observée par Western (figure 49). Il ne semble donc pas y avoir de différence dans les niveaux d'expression de la protéine entre les différentes populations. Il est probable que la plus faible expression de N-cadhérine observée chez les populations CTD2 par IF ait en fait été reliée à la différence morphologique de ces populations. Parallèlement, aucune expression de la E-cadhérine n'a été observée chez les populations OVN95T hTERT par IF ou par Western (figure 50 et figure 51).

Chez les cancers épithéliaux de l'ovaire et chez les cellules métaplasiques, on observe souvent une diminution de l'expression de la N-cadhérine et l'apparition d'une expression de la E-cadhérine. Également, les OSE qui proviennent de femmes dotées d'une prédisposition génétique au cancer de l'ovaire expriment souvent E-cadhérine (WONG *et al.*, 1999). L'absence de modifications dans l'expression de ces protéines chez les différentes populations OVN95T hTERT appuie les observations faites un peu plus tôt qui indiquent que le CTD de CA125 n'est pas suffisant pour induire la transformation des OSE. Ces résultats appuient également le fait qu'aucune différence n'a été notée entre les populations lors de la microscopie électronique et lors des expériences de formation de sphéroïdes.

50.3. La portion CTD de CA125 n'influence pas le patron d'expression de la β -caténine

L'expression de la β -caténine a ensuite été vérifiée. Lorsque la protéine est exprimée à la membrane, la β -caténine est impliquée dans le maintien des jonctions adhérentes. La β -caténine peut également être exprimée selon un patron cytoplasmique et / ou nucléaire. Ce type de patron d'expression indique généralement que la voie de signalisation de Wnt/wingless est activée (DIETRICH, 2002). L'activation de la voie de Wnt permet entre autre d'activer indirectement la transcription de certaines protéines impliquées dans la prolifération cellulaire telles que c-Myc et la cycline D1 (RASK *et al.*, 2003). Des dérèglements du patron d'expression de la β -caténine impliquent souvent l'activation ou la dérégulation de

la voie de Wnt. Cette voie dans laquelle la β -caténine est impliquée est fréquemment dérégulée chez les cancers de l'ovaire (RASK *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus indiquent une expression exclusive de la β -caténine à la membrane des cellules (figure 52). Le patron d'expression observé est similaire à celui de la N-cadhérine. Il est en effet probable que, vu sa localisation membranaire, la β -caténine soit liée à la queue cytoplasmique de la N-cadhérine (RASK *et al.*, 2003). Selon la littérature, le patron d'expression membranaire de la β -caténine qui a été observé correspond au patron d'expression typiquement retrouvé chez les OSE (RASK *et al.*, 2003). Ainsi, la portion CTD de CA125 ne semble pas favoriser une localisation cytoplasmique ou nucléaire de la β -caténine comme c'est parfois le cas dans le cancer de l'ovaire.

50.4. Aucun effet du CTD de CA125 sur les jonctions cellulaires et les protéines qui y sont associées

Ainsi, aucune différence n'a été observée au niveau de l'expression des différentes protéines d'adhésions étudiées ou au niveau des différentes jonctions observées par microscopie électronique suggérant que le CTD de CA125 n'induit pas de modifications à ce niveau. Également, aucune modification dans le patron d'expression des cadhérines n'a été observée chez les populations CTD2. Des modifications dans l'expression de ces protéines auraient pu indiquer une progression des cellules vers un état métaplasique. Ainsi, le changement de

morphologie des OVN95T hTERT CTD2 ne semble pas avoir été accompagné de changements au niveau des jonctions cellules-cellules.

51. Analyse des effets du CTD de CA125 sur le cytosquelette

On observe souvent des changements au niveau du patron d'expression de protéines du cytosquelette lors de transformation cellulaire ou lors d'une EMT. Bien que les cellules ne semblent pas avoir été transformées par l'expression du CTD de CA125, un changement de morphologie s'apparentant à une EMT a été observé chez les différentes populations CTD2. De plus, les populations contrôles pourraient avoir subi une EMT induite par les conditions de culture cellulaire. Dans ce cas, la comparaison des populations contrôles avec les populations CTD2 aurait pu faussés les résultats obtenus. Ainsi, le patron d'expression de différentes protéines du cytosquelette a été analysé afin de mieux caractériser la EMT des populations CTD et des populations contrôles.

51.1. EMT chez toutes les populations OVN95T hTERT

Afin de mieux analyser le changement de morphologie observé chez les populations CTD2, le patron d'expression de marqueurs épithéliaux et le patron d'expression d'un marqueur mésenchymateux ont été analysés.

L'expression des cytokératines 8 et 18 a d'abord été vérifiée. La littérature indique que les OSE expriment généralement ces marqueurs épithéliaux (AUERSPERG *et al.*, 2001). Cependant, leur expression tend à diminuer en fonction de la EMT que subissent les OSE en culture (AUERSPERG *et al.*, 2001). Les cytokératines 8 et 18 n'ont pas été détectées chez les différentes populations OVN95T hTERT (figure 53) suggérant que les populations OVN95T hTERT CTD2 et leurs populations contrôles OVN95T hTERT, GFP et Cyto6 ont subi une EMT.

L'expression de la vimentine chez toutes les populations OVN95T hTERT semble également confirmer l'état mésenchymateux des cellules et donc la EMT des cellules (figure 54). La vimentine est en effet un marqueur mésenchymateux. Bien que la vimentine soit normalement exprimée chez les OSE, la présence de vimentine et l'absence des cytokératines semblent indiquer une EMT plus complète que celle des OSE normalement retrouvées à la surface des ovaires. En effet, les OSE expriment généralement à la fois les cytokératines et la vimentine. Une expression exclusive de la vimentine chez ces cellules indique donc que les cellules sont devenues principalement mésenchymateuses (AUERSPERG *et al.*, 2001). Un patron d'expression de la vimentine légèrement différent a été observé chez les populations CTD2. Chez ces cellules, le patron d'expression de la vimentine semblait plus allongé que chez les populations contrôles. La morphologie des cellules est d'ailleurs influencée par l'organisation de la vimentine. Il est donc possible que la morphologie plus allongée des populations CTD2 ait été causée par le patron d'expression plus allongé de la vimentine chez ces cellules. La présence

du CTD de CA125 semble donc avoir affecté légèrement le patron d'expression de la vimentine. Le mécanisme impliqué demeure cependant un inconnu.

Le patron d'expression des différentes protéines du cytosquelette étudiées semblent appuyer la possibilité que certains phénotypes associés à l'expression de la construction CTD2 aient été masqués par la EMT des cellules contrôles. Également, il devient difficile d'affirmer que le CTD de CA125 puisse en soi induire une EMT chez les cellules. Des résultats non présentés dans ce mémoire ont cependant démontrés que l'expression du CTD de CA125 chez des OSE fraîchement prélevées à des patientes induit automatiquement l'acquisition d'une morphologie mésenchymateuse avant même que les cellules parentales n'adoptent une morphologie mésenchymateuse (données non illustrées obtenues par Jean-Philippe Babeu). Cependant l'instabilité de la morphologie épithéliale des OSE ne permet pas d'effectuer des expériences plus poussées sur ces cellules avant leur EMT. Finalement, la morphologie adoptée par les populations OVN95T hTERT CTD2 est plus allongée que celles des populations contrôles. Le CTD de CA125 semble donc influencer celle-ci indépendamment des conditions de culture.

51.2. Le CTD de CA125 n'influence pas le patron d'expression de la F-actine

L'actine est une protéine qui influence grandement la morphologie cellulaire. Les structures formées par l'actine sont impliquées au niveau de plusieurs différentes

fonctions dont la migration, l'adhésion et la signalisation. La façon dont l'actine est organisée dans une cellule influence les fonctions et le phénotype de celle-ci. La détection de la F-actine chez les cellules n'a démontré aucune différence entre les différentes populations OVN95T hTERT. Chez les cellules, l'actine semblait organisée en fibres de stress (figure 55). Les fibres de stress apparaissent sous forme de filaments qui parcourent le cytoplasme de la cellule. Leur abondance à l'une des extrémités de la cellule indique généralement le sens de la migration des cellules. Chez les OSE, une organisation de la F-actine en fibre de stress est associée à un état cellulaire normal. Lors d'une transformation graduelle des OSE, les fibres de stress cèdent peu à peu la place à un patron d'expression plus membranaire et concentré aux sites d'interaction avec d'autres cellules (ROBERTS *et al.*, 2005; CHAUHAN *et al.*, 2009). Ainsi, les résultats indiquent que les cellules ont gardé des caractéristiques relativement normales malgré leur immortalisation par la télomérase. Également, les patrons d'expression observés ne semblent pas illustrer de transition vers un état métaplasique.

52. Analyse de la voie de signalisation du HGF

La voie de signalisation HGF/MET est impliquée dans de nombreux cancers. Au niveau des cancers de l'ovaire, cette voie augmente la prolifération, la migration et favorise l'apparition de métastases (ZHOU *et al.*, 2008). Le HGF est généralement exprimé par les cellules mésothéliales et permet la stimulation paracrine des cellules épithéliales qui elles, expriment habituellement le récepteur MET. Chez les OSE en

culture, on observe une diminution de l'expression du récepteur MET en fonction de l'acquisition d'un caractère plus méshenchymateux. Toutefois, chez les OSE dotées d'une prédisposition génétique au cancer de l'ovaire, l'expression de MET demeure souvent relativement stable (AUERSPERG *et al.*, 2001). Chez plusieurs OSE prédisposées génétiquement au cancer de l'ovaire, on observe même une co-expression du HGF et de son récepteur. Cette co-expression chez les OSE favoriserait peut être la transformation des cellules et l'apparition d'un cancer de l'ovaire (AUERSPERG *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2008).

Vu l'implication de cette voie au niveau de la migration cellulaire et le changement morphologique observé chez les populations OVN95T hTERT CTD2, une différence dans la voie de signalisation de HGF/MET aurait pu être présente chez les différentes populations. Les résultats obtenus indiquent qu'il n'existe aucune différence dans la voie de signalisation HFG/MET chez les différentes populations (figure 56). Ainsi, le niveau d'expression du récepteur MET était similaire chez toutes les populations analysées. Une plus forte expression de la protéine chez les populations CTD aurait pu indiquer une plus grande susceptibilité à la transformation (ZHOU *et al.*, 2008).

Puisque la voie de HGF/MET peut stimuler la prolifération à travers l'activation de la voie de PI3K/AKT, les niveaux d'expression de AKT et de la phosphorylation qui active cette protéine ont été analysés. Chez les différentes populations, des niveaux d'expression similaires d'AKT ont été observés en fonctions des conditions

utilisées. La voie de PI3K/AKT ne semblait pas fortement activée chez les cellules non exposées au HGF. Chez les OSE prédisposées au développement d'un cancer de l'ovaire, on retrouve souvent une forte activation de cette voie par stimulation autocrine (AUERSPERG *et al.*, 2001). L'observation d'une augmentation de la phosphorylation d'AKT chez les populations OVN95T hTERT CTD2 aurait pu indiquer une évolution des cellules vers un état métaplasique.

Lors de l'expérience, la phosphorylation Y1003 de MET, une phosphorylation qui entraîne la dégradation de la protéine, a également été analysée. Les variations dans la phosphorylation de la protéine correspondaient aux niveaux d'expression de la protéine MET. Il est donc difficile d'affirmer que le taux de phosphorylation de la protéine ait changé en fonction de l'exposition au HGF. Également, aucune différence au niveau de la phosphorylation de MET n'a été observée entre les différentes populations.

Les résultats obtenus indiquent donc que la portion CTD de CA125 n'affecte pas la voie de signalisation HGF/MET. Encore une fois, aucune transition des cellules vers un état métaplasique n'a été notée.

Conclusions

53. Les effets du CTD de CA125 semblent retreints aux cellules cancéreuses

L'expression de la portion CTD de CA125 semble favoriser fortement différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité chez la lignée cancéreuse de l'ovaire SKOV-3. Des effets ont été notés au niveau de la sensibilité des cellules à différents agents génotoxiques, de l'inhibition de contact des cellules et au niveau de l'indépendance des cellules à différents signaux de croissance. Ces effets étaient particulièrement impressionnants lors des expériences effectuées chez des modèles animaux. Les résultats obtenus avec cette lignée cellulaire laissaient penser que la protéine serait peut être un oncogène. Paradoxalement, lors des expériences effectuées chez les cellules non-transformées, peu d'effets ont pu être associés à l'expression du CTD de CA125. Aucune des cellules non-transformées immortalisées ou non n'ont été transformées par l'expression de la portion CTD de CA125. Un changement de morphologie pouvant indiquer l'induction d'une EMT chez les populations exprimant le CTD de CA125 a été observée. Cependant, les expériences effectuées sur les cellules n'ont pas permis d'associer des effets de la portion CTD de CA125 aux différentes caractéristiques associées à la tumorigénicité étudiées.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les résultats obtenus. Il est possible que les effets de la portion CTD de CA125 passent par une co-expression avec d'autres oncogènes. En effet, la lignée SKOV-3 étant une lignée cellulaire cancéreuse, plusieurs oncogènes y sont probablement activés comparativement aux cellules non-transformées immortalisées ou non qui ont été utilisées par la suite. En ce qui a trait à l'absence de transformation chez les cellules exprimant la portion CTD de CA125, la majorité des oncogènes ne sont pas en mesure de transformer seule des cellules. Ainsi, l'expression de plusieurs oncogènes est souvent nécessaire à la transformation cellulaire. De plus, les cellules humaines sont plus difficilement transformables que les cellules murines. Ainsi, peut être qu'une meilleure infection des cellules murine NIH 3T3 aurait permis de voir des foyers de transformation chez ces cellules. Également, une transformation éventuelle de cellules par CA125 passe peut être par l'expression d'une plus grande portion de la protéine ou par l'expression de domaines non étudiés lors de ce projet. Finalement, une autre possibilité serait que les effets de la portion CTD de CA125 chez les OSE auraient été masqués par la EMT des cellules contrôles induite par les conditions de culture cellulaire.

54. Perspectives

Il serait intéressant de vérifier les effets de la portion CTD de CA125 sur des cellules dotées d'une morphologie épithéliales plus stable. La stabilisation de la morphologie épithéliale des OSE pourrait possiblement être obtenue en induisant

l'expression de la E-cadhérine chez ces cellules. Ceci permettrait entre d'autre d'étudier plus adéquatement le changement de morphologie induit par l'expression de la portion CTD de CA125 qui semble s'apparenter à une EMT. L'utilisation de telles cellules offrirait également une meilleure base de comparaison pour les populations expérimentales CTD. L'étude de constructions de CA125 dotées de domaines supplémentaires de la protéine pourrait également être intéressante. Finalement, l'utilisation de constructions dotées d'étiquettes moléculaires différentes aux deux extrémités de la protéine permettrait également de vérifier si la protéine est bel et bien clivée comme semble l'indiquer certain Western effectués lors de la validation des populations CTD.

Remerciements

Je souhaiterais remercier tout ceux et celles qui m'ont aidé lors de ma maîtrise à l'Université de Sherbrooke. Tout d'abord l'Université de Sherbrooke qui a en partie financé ma maîtrise et qui a rendu celle-ci possible. Le CRSNG pour le financement partiel de ma maîtrise. Merci à Dre. Claudine Rancourt qui m'a acceptée dans son laboratoire et qui m'a permise de vivre ma première vraie expérience de recherche scientifique. Merci à Martine Migneault, Nadzeya Goncharenko et à Marina Comamala pour leur aide lors des difficultés rencontrées et pour les discussions scientifiques qui m'ont aidée à bâtir ce mémoire. Merci aux autres membres du laboratoire qui m'ont également aidée à de nombreuses occasions soit, Jean-Philippe Babeu, Isabelle Matte, Denis Lane et le Dr. Alain Piché. Merci aux stagiaires et aux anciens du laboratoire. Merci à mes amis extérieurs au laboratoire principalement Jason Arsenault, Larry Foisy ainsi que les autres adultes de l'École de Karaté Larry Foisy. Finalement, merci à ma famille, ma mère, mon père, mon frère et mon chien pour leur soutien inconditionnel lors des moments les plus ardues.

Références

Ahmed N, Thompson EW et Quinn MA. (2007) Epithelial-Mesenchymal Interconversions in Normal Ovarian Surface Epithelium and Ovarian Carcinomas : An Exception to the Norm. *Journal of Cellular Physiology*. 213: 581-588.

Alberts B, Alexander J, Lewis J, Raff M, Roberts K et Walter P. (2008) Molecular Biology of the Cell; Fifth Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, an informa business. New York. États-Unis. Chapitre 19.

Aletti GD, Gallenberg MM, Cliby WA, Jatoi A et Hartmann LC. (2007) Current Management Strategies for Ovarian Cancer. *Mayo Clinic Proceedings*. 82 (6): 751-770.

Andersch-Björkman Y, Thomsson KA, Holmén Larsson JM, Ekerhovd E et Hansson GC. (2007) Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus During the Menstrual Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics*. 6: 708-716.

Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg Å, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski K, Kallioniemi O-P, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG et Easton DF. (2003) Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. *The American Journal of Human Genetics*. 72 (5): 1117-1130.

Auersperg N, Wong AST, Choi K-C, Kang SK et Leung PCK. (2001) Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. *Endocrine Reviews*. 22 (2): 255-288.

Axelsson MAB, Asker N et Hansson GC. (1998) O-Glycosylated MUC2 Monomer and Dimer from LS 174T Cells Are Water-soluble, whereas Larger MUC2 Species Formed Early during Biosynthesis Are Insoluble and Contain Nonreducible Intermolecular Bonds. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (30): 18864-18870.

Bafna S, Singh AP, Moniaux N, Eudy JD, Meza JL et Batra SK. (2008) MUC4, a Multifunctional Transmembrane Glycoprotein, Induces Oncogenic Transformation of NIH3T3 Mouse Fibroblast Cells. *Cancer Research*. 68 (22): 9231-9238.

Balmain A et Harris CC. (2000) Carcinogenesis in Mouse and Human Cells : Parallels and Paradoxes. *Carcinogenesis*. 21 (3): 371-377.

Barbati A, Lauro V, Orlacchio A et Cosmi EV (1996) Immunoblotting Characterization of CA 125 in Biological Fluids: Difference Between Pregnancy and Cancer CA 125 Origin. *Anticancer Research*. 16: 3621-3624.

Bast RC, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RC et Knapp RC (1981) Reactivity of a Monoclonal Antibody with Human Ovarian Carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation*. 68: 1331-1337.

Bast RC, Klug TL, St. John E, Jenison E, Nilloff JM, Lazarus H, Berkowitz RS, Leavitt T, Griffiths T, Parker L, Zurawski VR et Knapp RC. (1983) A Radioimmunoassay Using a Monoclonal Antibody to Monitor the Course of Epithelial Ovarian Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 309 (15): 883-887.

Bast RC, Xu F-J, Yu Y-H, Barnhill S, Zhang Z et Mills GB (1998) CA125: The Past and the Future. *The International Journal of Biological Markers*. 13 (4): 179-187.

Beaudin J. Anticorps monovalents modifiés anti-CA125: Nouveaux inhibiteurs de l'antigène tumoral CA125. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. 142 pages. Juin 2003.

Belisle JA, Gubbels JAA, Raphael CA, Migneault M, Rancourt C, Connor JP et Patankar MS. (2007) Peritoneal Natural Killer Cells from Epithelial Ovarian Cancer Patients Show an Altered Phenotype and Bind to the Tumour Marker MUC16 (CA125). *Immunology*. 122 (3): 418-429.

Boivin M. Implication de CA125 (MUC16) dans la sensibilité des cellules de cancer de l'ovaire aux agents génotoxiques. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. 146 pages. Juin 2005.

Bradford MM. (1976) A Rapid Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Chan MM, Fong D, Soprano KJ, Holmes WF et Heverling H. (2002) Inhibition of Growth and Sensitization to Cisplatin-Mediated Killing of Ovarian Cancer Cells by Polyphenolic Chemopreventive. *Journal of Cellular Physiology*. 194 (1): 63-70.

Chaturvedi P, Singh AP, Moniaux N, Senapati S, Chakraborty S, Meza JL et Batra SK (2007) MUC4 Mucin Potentiates Pancreatic Tumor Cell Proliferation, Survival, and Invasive Properties and Interferes with Its Interaction to Extracellular Matrix Proteins. *Molecular Cancer Research*. 5 (4): 309-320.

Chauhan SC, Vannatta K, Ebeling MC, Vinayek N, Watanabe A, Pandey KK, Bell MC, Koch MD, Aburatani H, Lio Y et Jaggi M. (2009) Expression and Functions of Transmembrane Mucin MUC13 in Ovarian Cancer. *Cancer Research*. 69 (3): 765-774.

Colombo N, Gorp TV, Parma G, Amant F, Gatta G, Sessa C et Vergote I. (2006) Ovarian Cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 60: 159-179.

Coussens LM et Werb Z. (1996) Matrix Metalloproteinases and the Development of Cancer. *Chemistry & Biology*. 3: 895-904.

Croce CM. (2008) Oncogene and Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 358 (5): 502-511.

Croce MV, Isla-Larrain MT, Rua CE, Rabassa ME, Gendler SJ et Segal-Eiras A. (2003) Patterns of MUC1 Tissue Expression Defined by an Anti-MUC1 Cytoplasmic Tail Monoclonal Antibody in Breast Cancer. *The journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 51 (6): 781-788.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA et Bouck N. (1994) Control of Angiogenesis in Fibroblast by p53 Regulation of Thrombospondin-1. *Science*. 265: 1582-1584.

Davis HM, Zurawski VR, Bast RC et Klug TL. (1986) Characterization of the CA125 Antigen Associated with Human Epithelial Ovarian Carcinomas. *Cancer Research*. 46: 6143-6148.

Deligdisch L, Einstein AJ, Guera D et Gil J. (1995) Ovarian Dysplasia in Epithelial Inclusion Cysts. *Cancer*. 76 (6): 1027-1034.

Desseyn J-L, Tetaert D et Grouyer V. (2008) Architecture of the Large Membrane-Bound Mucins. *Gene*. 410: 215-222.

Dietrich C, Scherwat J, Faust D et Oesch F. (2002) Subcellular Localization of β -Catenin is Regulated by Cell Density. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 292: 195-199.

Cheon D-J, Wang Y, Deng JM, Lu Z, Xiao L, Chen C-M, Bast RC Jr. et Behringer RR. (2009) CA125/MUC16 Is Dispensable for Mouse Development and Reproduction. *PLoS ONE*. 4 (3): e4675.

Dorigo O et Berek JS. (2007) CA125: Megadaltons of Novel Opportunities. *Gynecologic Oncology*. 104 (3): 505-507.

DuBois A, Lück H-J, Meier W, Adams H-P, Möbus V, Costa S, Bauknecht T, Richter B, Warm M, Schröder W, Olbricht S, Nitz U, Jackisch C, Emons G, Wagner U, Kuhn W et Pfisterer J. (2003) A Randomized Clinical Trial of Cisplatin/Paclitaxel Versus Carboplatin/Paclitaxel as First-Line Treatment of Ovarian Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 95 (17): 1320-1329.

Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S et Kufe D (2006) Distinct Evolution of the Human Carcinoma-Associated Transmembrane Mucins, MUC1, MUC4 and MUC16. *Gene*. 373: 28-34.

Fathalla MF. (1971) Incessant Ovulation: a Factor in Ovarian Neoplasia? *Lancet*. 2 (7716): 163.

Felsher DW. (2008) Reversing Cancer From Inside and Out: Oncogene Addiction, Cellular Senescence, and the Angiogenic Switch. *Lymphatic Research and Biology*. 6 (3-4): 149-154.

Fendrick JL, Konishi I, Geary SM, PArmley TH, Quirk JG et O'Brien TJ. (1997) CA125 Phosphorylation Is Associated with Its Secretion from the Wish Human Amnion Cell Line. *Tumor Biology*. 18: 278-289.

Fidler IJ. (1990) Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: Twenty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Research*. 50: 6130-6138.

Folkman J. (2006) Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*. 57: 1-18.

Friedl P. (2004) Prespecification and Plasticity: Shifting Mechanisms of Cell Migration. *Current Opinion in Cell Biology*. 16 (1): 14-23.

Frisch SM et Francis H. (1994) Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. 124 (4): 619-626.

Gaetje R, Winnekendonk DW, Ahr A et Kaufmann M. (2002) Ovarian Cancer Antigen CA 125 Influences Adhesion of Human and Mammalian Cell Lines In Vitro. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*. 29 (1): 34-36.

Gendler SJ, Burchell JM, Duhig T, Lamport D, White R, Parker M et Taylor-Papadimitriou J. (1987) Cloning of Partial cDNA Encoding Differentiation and Tumor-Associated Mucin Glycoproteins Expressed by Human Mammary Epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84 (17): 6060-6064.

Gimbrone Jr. MA, Leapman SB, Cotran RS et Folkman J. (1972) Tumor Dormancy In Vivo by Prevention of Neovascularization. *The Journal of Experimental Medicine*. 136: 261-276.

Gubbels JA, Belisle J, Onda M, Rancourt C, Migneault M, Ho M, Bera TK, Connor J, Sathyanarayana BK, Lee B, Pastan I et Patankar MS. (2006) Mesothelin-MUC16 Binding is a High Affinity, N-Glycan Dependent Interaction that Facilitates Peritoneal Metastasis of Ovarian Tumors. *Molecular Cancer*. 5 (1): 50-65.

Gupta GP et Massagué J. (2006) Cancer Metastasis : Building a Framework. *Cell*. 127 (4) : 679-695.

Hanahan D. et Weinberg R.A. (2000) The Hallmark of Cancer. *Cell*. 100: 57-70.

Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S et Mandelboim O. (2006) Decidual NK Cells Regulate Key Developmental Processes at the Human Fetal-Maternal Interface. *Nature Medecine*. 12 (9) : 1065-1074.

Harley CB (1991) Telomere Loss: Mitotic Clock or Genetic Time Bomb? *Mutation Research*. 256 (2-6): 271-282.

Hayflick L (2000) The Illusion of Cell Immortality. *British Journal of Cancer*. 83 (7): 841-846.

Hermansson M., Nistér M., Betsholtz C., Heldin CH., Westermark B. et Funa K. (1988) Endothelial Cell Hyperplasia in Human Glioblastoma: Coexpression of mRNA for Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) B Chain and PDGF Receptor Suggests Autocrine Growth Stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85 (20): 7748-7752.

Herrup K. et Yang Y. (2007) Cell Cycle Regulation in the Postmitotic Neuron : Oxymoron or New Biology. *Nature Reviews Neuroscience*. 8: 368-378.

Høgdall EV, Christensen L, Kjaer S, Blaakaer J, Kjaerbye-Thygesen A, Gayther S, Jacobs IJ et Høgdall CK. (2007) CA125 Expression Pattern, Prognosis and Correlation with Serum CA125 in Ovarian Tumor Patients: From The Danish “Mallova” Ovarian Cancer Study. *Gynecologic Oncology*. 104 (3): 508-515.

Hollingsworth MA et Swanson BJ. (2004) Mucins in Cancer: Protection and Control of the Cell Surface. *Nature Reviews. Cancer*. 4 (1): 45-60.

Huang L, Ren J, Chen D, Li Y, Kharbanda S et Kufe D. (2003) MUC1 Cytoplasmic Domain Coactivates Wnt Target Gene Transcription and Confers Transformation. *Cancer biology & Therapy*. 2 (6): 702-706.

Jacob I et Bast RC Jr. (1989) The CA 125 Tumour-Associated Antigen: A Review of the Literature. *Human Reproduction*. 4 (1): 1-12.

Jainchill JL, Aaronson SA et Todaro GJ. (1969) Murine Sarcoma and Leukemia Viruses : Assay Using Clonal Lines of Contact-Inhibited Mouse Cells. *Journal of Virology*. 4 (5): 549-553.

Johnson JP. (1991) Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Supergene Family and their Role in the Malignant Transformation and Progression to Metastatic Disease. *Cancer and Metastasis Reviews*. 10: 11-22.

Kabawat SE, Bast RC, Welch WR, Knapp RC et Colvin RB. (1983) Immunopathologic Characterization of a Monoclonal Antibody that Recognizes Common Surface Antigens on Human Ovarian Tumors of Serous, Endometrioid and Clear Cell Types. *American Journal of Clinical Pathology*. 79: 98-104.

Kallakury BVS, Sheehan CE, Winn-Deen E, Oliver J, Fisher HAG, Kaufman RP Jr, Ross JS. (2001) Decreased Expression of Catenins (α and β), p120 CTN, and E-Cadherin Cell Adhesion Proteins and E-Cadherin Gene Promoter Methylation in Prostatic Adenocarcinomas. *Cancer*. 92 (11): 2786-2795.

Karlseder J., Broccoli D., Dai Y., Hardy S. et de Lange T. (1999) p53- and ATM-Dependent Apoptosis Induced by Telomeres Lacking TRF2. *Science*. 283 (5406): 1321-1325.

Kerbel RS. (1993) Growth Factors as Mediators of Malignant Tumor Progression. *Cancer and Metastasis Reviews*. 12: 215-217.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL et Shay JW. (1994) Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science*. 266 (5193): 2011-2015.

Konishi I, Fendrick JL, Parmley TH, Quirk JG et O'Brien TJ. (1994) Epidermal Growth Factor Enhances Secretion of the Ovarian Tumor-Associated Cancer Antigen CA125 from the Human Amnion WISH Cell Line. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 1 (1): 89-96.

Kruk PA, Uitto V-J, Firth JD, Dedhar S et Auersperg N. (1994) Reciprocal Interaction between Human Ovarian Surface Epithelial Cells and Adjacent Extracellular Matrix. *Experimental Cell Research*. 215: 97-108.

Lan MS, Batra SK, Qi W-N, Metzgar RS et Hollingsworth MA. (1990) Cloning and Sequencing of a Human Pancreatic Tumor Mucin cDNA. *The Journal of Biological Chemistry*. 265 (25): 15294-15299.

Landen CN Jr, Birrer MJ et Sood AK. (2008) Early Events in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 26 (6): 995-1005.

Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, Kiss R et Lefranc F. (2009) Galectins and Gliomas. *Brain Pathology*. Published online.

Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S et Kufe D. (2003) Human DF3/MUC1 Carcinoma-Associated Protein Functions as an Oncogene. *Oncogene*. 22 (38): 6107-6110.

Lloyd KO, Yin BWT et Kudryashov V. (1997) Isolation and Characterization of Ovarian Cancer Antigen CA 125 Using a New Monoclonal Antibody (VK-8): Identification as a Mucin-Type Molecule. *International Journal of Cancer*. 71: 842-850.

Lowe SW. et Lin AW. (2000) Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis*. 21 (3): 485-495.

Lowe SW., Schmitt EM., Smith SW., Osborne BA. et Jacks T. (1993) p53 is Required for Radiation-Induced Apoptosis in Mouse Thymocytes. *Nature*. 362 (6423): 847-849.

Macao B, Johansson DGA, Hansson GC et Hård T. (2006) Autoproteolysis Coupled to Protein Folding in the SEA Domain of the Membrane-Bound MUC1 Mucin. *Nature Structural & molecular Biology*. 13 (1): 71-76.

Maeda T, Inoue M, Koshiha S, Yabuki T, Aoki M, Nunokawa E, Seki E, Matsuda T, Motoda Y, Kobayashi A, Hiroyasu F, Shirouzu M, Terada T, Hayami N, Ishizuka Y, Shinya N, Tatsuguchi A, Yoshida M, Hirota H, Matsuo Y, Tani K, Arakawa T, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Kigawa T, Yokoyama S. (2004) Solution Structure of the SEA Domain From the Murine Homologue of Ovarian Cancer Antigen CA125 (MUC16). *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (13): 13174-13182.

Magnani JL, Steplewski Z, Koprowski H et Ginsburg V. (1983) Identification of the Gastrointestinal and Pancreatic Cancer-Associated Antigen Detected by Monoclonal Antibody 19-9 in the Sera of Patients as a Mucin. *Cancer Research*. 43: 5489-5492.

Markowitz S., Wang J., Myeroff L., Parsons R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan RS., Zborowska E., Kinzler KW., Vogelstein B., Brattain M. et Willson JKV. (1995) Inactivation of the Type II TGF- β Receptor in Colon Cancer Cells with Microsatellite Instability. *Science*. 268 (5215): 1336-1338.

Migneault M. Détermination des rôles du domaine extracellulaire de CA125 (MUC16) dans le cancer de l'ovaire. Mémoire. Université de Sherbrooke. Département de Microbiologie et Infectiologie. Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé. 135 pages. Septembre 2007.

Naora H et Montell DJ. (2005) Ovarian cancer metastasis : Integrating Insights From Disparate Model Organisms. *Nature reviews: Cancer*. 5: 355-366.

Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS, Connor TM, Lowe SW, Deichman GI et Gudkov AV. (1996) p53 Modulation of Anchorage Independent Growth and Experimental Metastasis. *Oncogene*. 13 (8): 1709-1719.

Nouwen EJ, Pollet DE, Eerdekens MW, Hendrix PG, Briers TW et De Broe ME. (1986) Immunohistochemical Localization of Placental Alkaline Phosphatase, Carcinoembryonic Antigen, and Cancer Antigen 125 in Normal and Neoplastic Human Lung. *Cancer Research*. 46: 866-876.

O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD et York L. (2001) The CA125 Gene: An Extracellular Superstructure Dominated by Repeat Sequence. *Tumor Biology*. 22: 348-366.

O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ et Shigemasa K. (2002) The CA 125 Gene: A Newly Discovered Extension of the Glycosylated N-Terminal Domain Doubles the Size of This Extracellular Superstructure. *Tumor Biology*. 23: 154-169.

Okamura H, Katabuchi H, Nitta M et Ohtake H. (2006) Structural Changes and Cell Properties of Human Ovarian Surface Epithelium in ovarian Pathophysiology. *Microscopy Research and Technique*. 69: 469-481.

Ong A., Maines-Bandiera SL, Roskelley CD et Auersperg N. (2000) An Ovarian Adenocarcinoma Line Derived from SV40/E-cadherin-Transfected Normal Human Ovarian Surface Epithelium. *International Journal of Cancer*. 85 (3): 430-437.

Ordway JM, Williams K et Curran T. (2004) Transcription Repression in Oncogenic Transformation: Common Targets of Epigenetic Repression in Cells Transformed by Fos, Ras or Dnmt 1. *Oncogene*. 23: 3737-3748.

Ozols RF. (2002) Recurrent Ovarian Cancer: Evidence-based Treatment. *Journal of Clinical Oncology*. 20 (5): 1161-1163.

Patankar MS, Jing Y, Morrison JC, Belisle JA, Lattanzio FA, Deng Y, Wong NK, Morris HR, Dell A et Clark GF. (2005) Potent Suppression of Natural Killer Cell Response Mediates by the Ovarian Tumor Marker CA125. *Gynecologic Oncology*. 99: 704-713.

Paterson AJ, Schlom J, Sears HF, Bennett J et Colcher D. (1986) A Radioimmunoassay for the Detection of a Human Tumor-Associated Glycoprotein (TAG-72) Using Monoclonal Antibody B72.3. *International Journal of Cancer*. 37 (5): 659-666.

Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J, Mangioni C, Simonsen E, Stuart G, Kaye S, Vergote I, Blom R, Grimshaw R, Atkinson RJ, Swenerton KD, Trope C, Nardi M, Kaern J, Tumolo S, Timmers P, Roy J-A, Lhoas F, Lindvall B, Bacon M, Birt A, Andersen JE, Zee B, Paul J, Baron B et Pecorelli S. (2000) Randomized Intergroup Trial of Cisplatin-Paclitaxel Versus Cisplatin-Cyclophosphamide in Women With Advanced Epithelial Ovarian Cancer: Three-Year Results. *Journal of the National Cancer Institute*. 92 (9): 699-708.

Popadiuk CM, Xiong J, Wells MG, Andrews PG, Dankwa K, Hirasawa K, Lake BB et Kao KR. (2006) Antisense Suppression of Pygopus2 Results in Growth Arrest of Epithelial Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 12: 2216-2223.

Poste G et Fidler IJ. (1979) The Pathogenesis of Cancer Metastasis. *Nature*. 283: 139-146.

Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T et Kerbel RS (1995) Mutant *ras* Oncogenes Upregulate VEGF/VPF Expression: Implications for Induction and Inhibition of Tumor Angiogenesis. *Cancer Research*. 55: 4575-4580.

Rask K, Nilsson A, Brännström M, Carlsson P, Hellberg P, Janson P-O, Hedin L et Sundfeldt K. (2003) Wnt-Signalling Pathway in Ovarian Epithelial Tumours: Increased Expression of β -Catenin and GSK3 β . *Molecular and Cellular Pathology*. 89: 1298-1304.

Reddel RR. (1998) A Reassessment of the Telomere Hypothesis of Senescence. *BioEssays*. 20 (12): 977-984.

Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu W-H, Huang L, Raina D, Chen W, Kharbanda S et Kufe D. (2004) Human MUC1 Carcinoma-Associated Protein Confers Resistance to Genotoxic Anticancer Agents. *Cancer Cell*. 5 (2): 163-175.

Ren J, Bharti A, Raina D, Chen W, Ahmad R et Kufe D. (2006) MUC1 Oncoprotein is Targeted to Mitochondria by Heregulin-Induced Activation of c-Src and the Molecular Chaperone HSP90. *Oncogene*. 25: 20-31.

Roberts PC, Mottillo EP, Baxa AC, Heng HHQ, Doyon-Reale N, Gregoire L, Lancaster WD, Rabah R et Schmelz EM. (2005) Sequential Molecular and Cellular Events during Neoplastic Progression: A Mouse Syngeneic Ovarian Cancer Model. *Neoplasia*. 7 (10): 944-956.

Rodeck U. (1993) Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development. *Cancer and Metastasis Reviews*. 12: 219-226.

Rubin H et Xu K. (1989) Evidence for the Progressive and Adaptative Nature of Spontaneous Transformation in the NIH 3T3 Cell Line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 (6): 1860-1864.

Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M et Miyajima A. (2004) Binding of Ovarian Cancer Antigen CA125/MUC16 to Mesothelin Mediates Cell Adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (10): 9190-9198.

Sambrook J et Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3e edition. CSHL Press. NY. 2001.

Schöck F et Perrimon N. (2002) Molecular Mechanisms of Epithelial Morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 18: 463-493.

Seelenmeyer C, Wegehinkel S, Lechner J et Nickel W. (2003) The Cancer Antigen CA125 Represents a Novel Counter Receptor for Galectin-1. *Journal of Cell Science*. 116 (7): 1305-1318.

Sers C, Riethmüller G et Johnson JP. (1994) MUC18, a Melanoma-Progression Associated Molecule, and Its Potential Role in Tumor Vascularization and Hematogenous Spread. *Cancer Research*. 54: 5689-5694.

Shay JW et Bacchetti S. (1997) A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer. *European Journal of Cancer*. 33 (5): 787-791.

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Miyazama K, Kitamura N, Johnson KR, Wheelock MJ, Matsuyoshi N, Takeichi M et Ito F. (1995) Association of p120, a Tyrosine Kinase Substrate with E-Cadherin/Catenin Complexes. *The Journal of Cell Biology*. 128 (5): 949-957.

Shield K, Riley C, Quinn MA, Rice GE, Ackland ML et Ahmed N. (2007) $\alpha 2\beta 1$ Integrin Affects Metastatic Potential of Ovarian Carcinoma Spheroids by Supporting Disaggregation and Proteolysis. *Journal of Carcinogenesis*. 6: 11-26.

Sierra JR, Corso S, Caione L, Cepero V, Conrotto P, Cignetti A, Piacibello W, Kumanogoh A, Kikutani H, Comoglio PM, Tamagnone L et Giordano S. (2008) Tumor Angiogenesis and Progression are Enhanced by Sema4D Produced by Tumor-Associated Macrophages. *The journal of Experimental Medicine*. 205 (7): 1673-1685.

Simpson CD, Anyiwe K et Schimmer AD. (2008) Anoikis Resistance and Tumor Metastasis. *Cancer Letters*. 272 (2): 177-185.

Singh PK et Hollingsworth MA. (2006) Cell Surface-Associated Mucins in Signal Transduction. *TRENDS in Cell Biology*. 16 (9): 467-476.

Thiery JP et Sleeman JR. (2006) Complex Networks Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 7 (2): 131-142.

Tsutsumida H, Swanson BJ, Singh PK, Caffrey TC, Kitajima S, Goto M, Yonezawa S et Hollingsworth MA. (2006) RNA Interference Suppression of MUC1 Reduces the Growth Rate and Metastatic Phenotype of Human Pancreatic Cancer Cell. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 12 (10): 2976-2987.

Tucker RW, Sanford KK, Handleman SL et Jones GM. (1977) Colony Morphology and Growth in Agarose as Tests for Spontaneous Neoplastic Transformation in Virto. *Cancer Research*. 37: 1571-1579.

Vaux DL., Cory S. et Adams JM. (1988) *Bcl-2* Gene Promotes Haemopoietic Cell Survival and Cooperates with *C-Myc* to Immortalize Pre-B Cells. *Nature*. 335 (6189): 440-442.

Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K et Augenlicht L. (2002) Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2. *Science*. 295 (5560): 1726-1729.

Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A., Ince TA et Weinberg RA. (2003) Ras Modulates Myc Activity to Repress Thrombospondin-1 Expression and Increase Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell*. 3: 219-231.

Weinberg AR. (1995) The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell*. 81: 323-330.

- Wen Y, Caffrey TC, Wheelock MJ, Johnson KR et Hollingsworth MA. (2003) Nuclear Association of the Cytoplasmic Tail of MUC1 and β -Catenin. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (39): 38029-38039.
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y et Johnson KR. (2008) Cadherin Switching. *Journal of Cell Science*. 121: 727-735.
- Whittmore AS, Harris R et Itnyre J. (1992) Characteristics Relating to Ovarian Cancer Risk: Collaborative Analysis of 12 US Case-Control Studies. *American Journal of Epidemiology*. 136 (10): 1184-1203.
- Wong AST et Auersperg N. (2003) Ovarian Surface Epithelium: Family History and Early Events in Ovarian Cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 1: 70-78.
- Wong AST, Maines-Bandiera SL, Rosen B, Wheelock MJ, Johnson KR, Leung PCK, Roskelley CD et Auersperg N. (1999) Constitutive and Conditional Cadherin Expression in Cultured Human Ovarian Surface Epithelium: Influence of Family History of Ovarian Cancer. *International Journal of Cancer*. 81 (2): 180-188.
- Wong NK, Easton RL, Panico M, Sutton-Smith M, Morrison JC, Lattanzio FA, Morris HR, Clark GF, Dell A et Patankar MS. (2003) Characterization of the Oligosaccharides Associated with the Human Ovarian Tumor Marker CA125. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (31): 28619-28634.
- Wu S, Boyer CM, Whitaker RS, Berchuck A, Wiener JR, Weinberg JB et Bast RC. (1993) Tumor Necrosis Factor α as an Autocrine and Paracrine Growth Factor for Ovarian Cancer: Monokine Induction of Tumor Cell Proliferation and Tumor Necrosis Factor α Expression. *Cancer Research*. 53: 1939-1944.

Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y, Li F, Dewhirst MW et Li C-Y. (2006) Tumor Necrosis Factor- α Is a Potent Endogenous Mutagen that Promotes Cellular Transformation. *Cancer Research*. 66: 11565-11570.

Yao JJ, Liu Y, Lacorazza HD, Soslow RA, Scandura M, Nimer SD et Hedvat CV. (2007) Tumor Promoting Properties of the ETS Protein MEF in Ovarian Cancer. *Oncogene*. 26: 4032-4037.

Yilmaz M et Christofori G. (2009) EMT, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion. *Cancer Metastasis Review*. 28: 15-33.

Yin BWT, Dnistrian A et Lloyd KO (2002) Ovarian Cancer Antigen CA125 is Encoded by the *MUC16* Mucin Gene. *International Journal of Cancer*. 98: 737-740.

Yin BWT et Lloyd KO (2001) Molecular Cloning of the CA125 Ovarian Cancer Antigen: Identification as a New Mucin. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (29): 27371-27375.

Yuan Z, Wong S, Borrelli A et Chung MA. (2007) Down-Regulation of MUC1 in Cancer Cells Inhibits Cell Migration by Promoting E-Cadherin/Catenin Complex Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 362 (3): 740-746.

Zetter BR. (1993) Adhesion Molecules in Tumor Metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 4 (4): 219-229.

Zhou HY, Pon YL et Wong AST. (2008) HGF/MET Signaling in Ovarian Cancer. *Current Molecular Medicine*. 8: 469-480.

Ziegler A., Jonason AS., Leffell DJ., Simon JA., Sharma HW., Kimmelman J., Remington L., Jacks T. et Brash DE. (1994) Sunburn and p53 in the Onset of Skin Cancer. *Nature*. 372: 773-776.